



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Zacatenco

Departamento de  
Fisiología, Biofísica y Neurociencias

Interacción molecular y funcional entre los  
receptores a adenosina  $A_{2A}$  y a histamina  $H_3$

Tesis que presenta:

M. en C. Ricardo Márquez Gómez

para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

en la especialidad de

Neurobiología Celular y Molecular

Director de Tesis: Dr. José Antonio Arias Montaña

Ciudad de México

Abril, 2018

## Agradecimientos

Al Dr. Richard M. van Rijn

Al Conacyt

## Índice de temas

Abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1 Sistema de los ganglios basales	4
1.2 Regulación de las NEMs por receptores acoplados a Proteínas G (GPCRs)	5
1.3 Sistema adenosinérgico, expresión y funcionalidad de los receptores a adenosina A <sub>2A</sub> en el neostriado	7
1.4 Sistema histaminérgico, expresión y funcionalidad de los receptores a histamina H <sub>3</sub> en el neostriado	9
1.5 Interacción entre los receptores A <sub>2A</sub> R y H <sub>3</sub> R y los receptores a dopamina D <sub>2</sub> /D <sub>1</sub>	11
2. Justificación	14
3. Hipótesis	15
4. Objetivos	16
5. Metodología	17
5.1 Generación de construcciones plasmídicas	17
5.2 Cultivo celular y transfección	18
5.3 Ensayos de formación de AMPc	18
5.4 Ensayos de movilización de calcio	19
5.5 Preparación de sinaptosomas del neostriado de rata	19
5.6 Ensayos de unión de radioligando	20
5.7 Ensayos de co-inmunoprecipitación	21
5.8 Ensayos de modelado molecular, acople proteína-proteína y dinámica molecular	22
5.9 Ensayos de Complementación Fluorescente Bimolecular	23

6. Resultados	25
6.1 Los receptores A <sub>2A</sub> y H <sub>3</sub> experimentan complementación funcional en células HEK-293T	25
6.2 La co-activación del dímero A <sub>2A</sub> R/H <sub>3</sub> R aumenta la señalización del A <sub>2A</sub> R	32
6.3 Co-inmunoprecipitación de los receptores A <sub>2A</sub> y 3xHA-H <sub>3</sub>	36
6.4 Ensayo de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC)	38
6.5 La activación del H <sub>3</sub> R disminuye la afinidad del A <sub>2A</sub> R en membranas estriatales	40
6.6 En sinaptosomas aisladas del neocórtex el H <sub>3</sub> R co-inmunoprecipita con el A <sub>2A</sub> R	43
6.7 Estudio de la interface de interacción del heterodímero A <sub>2A</sub> R/H <sub>3</sub> R	44
7. Discusión	51
7.1 Interacción A <sub>2A</sub> R/H <sub>3</sub> R	51
7.2 Localización sináptica de la interacción A <sub>2A</sub> R/H <sub>3</sub> R	54
7.3 Sobre la interface de contacto del heterodímero A <sub>2A</sub> R/H <sub>3</sub> R	55
7.4 Sobre la formación de heterodímeros	56
7.5 Los heterodímeros en el tratamiento de desórdenes neuronales	58
8. Conclusión	61
9. Perspectivas	62
9. Referencias	63
Anexo - Publicaciones	71

## Abreviaturas

[ <sup>3</sup> H]-NAMH	[3H]-N-metilhistamina
A <sub>2A</sub> R	Receptor a adenosina A <sub>2A</sub>
AD	Adenosina
AE	Asa intracelular
AI	Asa intracelular
AMPC	3'-5'-Mono fosfato cíclico de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CT	Carboxilo terminal
D <sub>1</sub> R	Receptor a dopamina D <sub>1</sub>
D <sub>2</sub> R	Receptor a dopamina D <sub>2</sub>
GABA	Ácido g-aminobutírico
GB	Ganglios basales
GP	Globo pálido
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
H <sub>2</sub> R	Receptor a histamina H <sub>2</sub>
H <sub>3</sub> R	Receptor a histamina H <sub>3</sub>
HA	Histamina
NEMs	Neuronas espinosas medianas
NT	Amino terminal
PKA	Cinasa A de proteínas
PKC	Cinasa C de proteínas
RAMH	R-a-metilhistamina
SNc	Sustancia negra parte compacta
SNC	Sistema nervioso central
SNr	Sustancia negra parte reticulada
STR	Neostriado

## Resumen

Los ganglios basales son un sistema de núcleos neuronales subcorticales involucrados en la regulación de procesos motores y cognitivos. El neostriado es el principal núcleo de entrada de la información sináptica del sistema, y está conformado principalmente por neuronas espinosas medianas (NEMs), las cuales reciben una importante innervación glutamatérgica de la corteza y el tálamo. A su vez, las NEMs originan las vías directa (dNEMs) e indirecta (iNEMs) de los ganglios basales. En el neostriado, los receptores a histamina H<sub>3</sub> (H<sub>3</sub>Rs) se co-expresan con los receptores a adenosina A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>Rs) en las aferentes glutamatérgicas cortico-estriatales y en las iNEMs GABAérgicas, permitiendo a ambos receptores modular dichos sistemas. Al inicio de este trabajo se desconocía si los H<sub>3</sub>Rs y A<sub>2A</sub>Rs interactuaban físicamente y molecularmente en el neostriado. Para abordar esta posibilidad, se utilizó un ensayo *in vitro* diseñado para detectar complementación funcional entre el receptor quimérico A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha$ <sub>qi4</sub> y el receptor nativo H<sub>3</sub>R. La activación del H<sub>3</sub>R con el agonista RAMH resultó en movilización de Ca<sup>2+</sup> (pEC<sub>50</sub> 7.31 ± 0.23; estimulación máxima, E<sub>max</sub>, 449 ± 25 % de la basal), indicativa de la formación de heterodímeros. La interacción H<sub>3</sub>R/A<sub>2A</sub>R fue confirmada por ensayos de co-inmunoprecipitación así como de formación de AMPc, en los que se observó un aumento en la señalización del A<sub>2A</sub>R. Los ensayos de Complementación Bimolecular Fluorescente mostraron complementación entre el A<sub>2A</sub>R y el H<sub>3</sub>R, apoyando la dimerización de los receptores. En membranas de sinaptosomas estriatales de la rata, la activación del H<sub>3</sub>R con RAMH disminuyó la afinidad del A<sub>2A</sub>R por el agonista CGS-21680 (pKi control 8.10 ± 0.04, pKi en presencia de RAMH 7.70 ± 0.04). Además, el A<sub>2A</sub>R y el H<sub>3</sub>R co-inmunoprecipitaron en extractos proteicos de sinaptosomas estriatales. El estudio mediante química computacional de la interface de interacción A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R mostró que 22 residuos del A<sub>2A</sub>R y 25 residuos del H<sub>3</sub>R forman una interface hidrofóbica. En conjunto, estos resultados apoyan la existencia de un heterodímero H<sub>3</sub>R/A<sub>2A</sub>R en células transfectadas y en el neostriado de la rata, y sustentan un nuevo mecanismo por el cual estos receptores podrían modular la función del neostriado y de los ganglios basales.

## Abstract

The basal ganglia form a system of subcortical neuronal nuclei involved in a wide variety of functions including movement and cognition. Within this system, the striatum is the main synaptic input nucleus and it is composed in 95% by medium-sized spiny projection neurons (MSNs), which receive a vast glutamatergic innervation from the cortex and thalamus. In turn, MSNs originate the direct and indirect pathways of the basal ganglia. In the striatum, histamine H<sub>3</sub> receptors (H<sub>3</sub>Rs) are co-expressed with adenosine A<sub>2A</sub> receptors (A<sub>2A</sub>Rs) on the cortico-striatal glutamatergic afferents and the GABAergic MSNs that originate the indirect pathway of the basal ganglia. This location allows H<sub>3</sub>Rs and A<sub>2A</sub>Rs to regulate the striatal GABAergic and glutamatergic transmission. However, whether these receptors interact physically to modulate the intra-striatal synaptic transmission had not yet been assessed. To test this hypothesis a heteromer-selective *in vitro* assay was used to detect functional complementation between a chimeric A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{q14}$  and wild-type H<sub>3</sub>Rs in transfected HEK-293T cells. H<sub>3</sub>R activation with the agonist RAMH resulted in Ca<sup>2+</sup> mobilization (pEC<sub>50</sub> 7.31  $\pm$  0.23; maximal stimulation, E<sub>max</sub>, 449  $\pm$  25 % of basal), indicative of receptor heterodimerization. Functional H<sub>3</sub>R-A<sub>2A</sub>R heteromers were confirmed by co-immunoprecipitation and modifications in cAMP signaling when both receptors were co-expressed in the same cells. In membranes from rat striatal synaptosomes, H<sub>3</sub>R activation decreased A<sub>2A</sub>R affinity for the agonist CGS-21680 (pKi control 8.10  $\pm$  0.04, pKi in the presence of RAMH 7.70  $\pm$  0.04). Moreover, H<sub>3</sub>Rs and A<sub>2A</sub>Rs co-immunoprecipitated in protein extracts from striatal synaptosomes. The bimolecular fluorescent complementation experiments showed a strong signal resulting from the interaction between A<sub>2A</sub>R and H<sub>3</sub>R, suggestive of dimerization. Furthermore, the computational study of the interface A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R showed 22 residues of the A<sub>2A</sub>R and 25 residues of the H<sub>3</sub>R to interact, mainly by hydrophobic interactions. These results support the existence of a H<sub>3</sub>R-A<sub>2A</sub>R heteromer, and reveal a new mechanism by which these receptors may modulate the function of the striatum and the basal ganglia.

## 1. Introducción

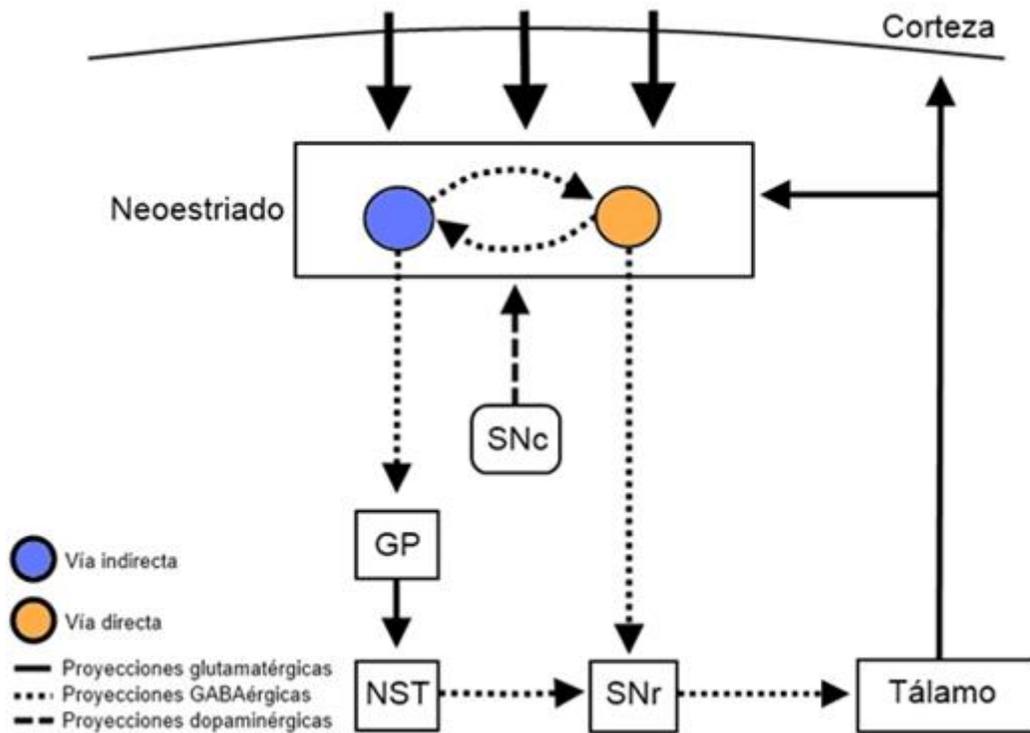
### 1.1 Sistema de los ganglios basales

Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales interconectados que regulan procesos motores y cognitivos, y que están por lo tanto relacionados con el desarrollo de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, el desorden de hiperactividad y déficit de atención (ADHD), la enfermedad de Huntington y el síndrome de Tourette (Cumming y Frankel, 1985; Haber y cols., 1986; Galvan y cols., 2006). En la rata, los GB (Figura 1) están conformados por el neostriado (STR), el globo pálido (GP), el núcleo subtalámico (NST) y la sustancia negra, en sus partes reticulada y compacta (SNr y SNC respectivamente; Bolam y cols., 2000).

El STR recibe aferencias glutamatérgicas corticales (Kemp y Powell, 1969) y talámicas (Smith y col., 2004), así como dopaminérgicas provenientes de la SNC (Albin y cols., 1989). Estas aferencias hacen del STR el principal núcleo de entrada sináptica del sistema de los GB, y la inervación cortical, talámica y nigral del STR otorga funcionalidad al sistema al actuar sobre las neuronas espinosas medianas (NEMs) GABAérgicas (Bolam y cols., 2000).

Las NEMs constituyen más del 95% de la población neuronal del STR (Kemp y Powell, 1971) y conforman en él dos poblaciones. La primera envía proyecciones al GP y forma la vía indirecta (estriado-palidal) de los GB, mientras que la segunda inerva a la SNr formando la vía directa (estriado-nigral). Aunado a esto, ambas poblaciones de las NEMs emiten proyecciones colaterales que modulan la actividad de la población neuronal vecina (Wilson y Groves, 1980; Somogyi y cols., 1982; Bolam y cols., 1983). Dada la naturaleza GABAérgica de ambas poblaciones de las NEMs, estas conexiones ejercen un efecto inhibitor debido a la activación de receptores GABA<sub>A</sub> post-sinápticos, y la densidad de estos receptores determina la magnitud de la corriente post-sináptica inhibitoria (Tunstall y cols., 2002, Koos y cols., 2004, Taverna y cols., 2008). Las NEMs estriado-nigrales tienen una densidad más alta de receptores GABA<sub>A</sub>, por lo que las NEMs de la vía indirecta

ejercen un mayor efecto inhibitorio sobre las neuronas de la vía directa (Taverna y cols., 2008).

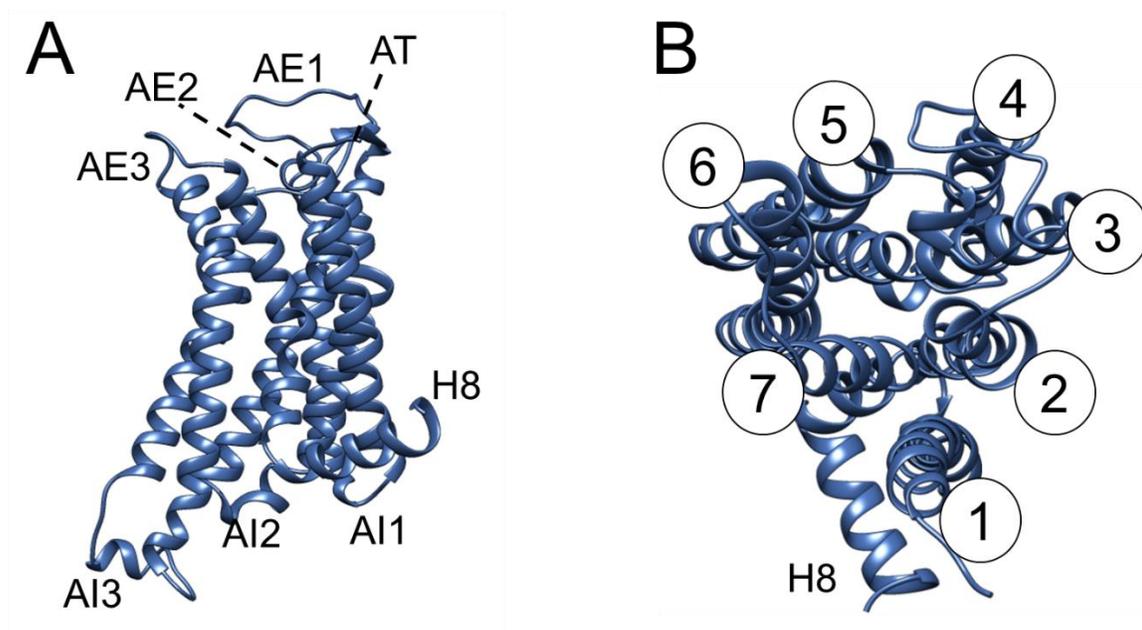


**Figura 1. Esquema general del circuito sináptico de los ganglios basales.** Además de proyectar al GP y a la SNr, las neuronas espinosas medianas (NEMs) emiten colaterales axonales que modulan la actividad de la población neuronal vecina. GP, globo pálido; NST, núcleo subtalámico; SNr, sustancia negra reticulada; SNc, sustancia negra compacta.

## 1.2 Regulación de las NEMs por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Los GPCRs constituyen una gran familia de proteínas membranales responsables de la señalización celular en respuesta a hormonas, neurotransmisores, quimocinas, odorantes e incluso fotones (Pierce y cols., 2002). Estructuralmente, los GPCRs poseen una sola cadena peptídica con el extremo amino en la región extracelular y el extremo carboxilo en el citoplasma, y 7 hélices  $\alpha$  transmembranales, formando así 3 asas intracelulares y 3 asas extracelulares

(Figura 2). Al activarse, un GPCR experimenta cambios conformacionales que resultan en la activación de un trímero proteico conformado por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  que en conjunto forman una proteína G. Estas proteínas G son partícipes primordiales en la transducción de señales intracelulares que regulan procesos fisiológicos y patológicos. Sin embargo, cada vez se conocen más proteínas accesorias que participan en la señalización de los GPCRs de manera independiente de las proteínas G (Heuss y Gerber, 2000).



**Figura 2. Estructura de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), representados por el receptor a adenosina A<sub>2A</sub>.** A. Vista lateral del receptor A<sub>2A</sub>. Se observan el extremo amino terminal (AT), las 3 asas extracelulares (AE) y las 3 asas intracelulares (AI), así como la octava hélice (H8). El extremo carboxilo terminal fue removido para una mejor visualización. B. Vista superior del receptor A<sub>2A</sub>. La figura muestra los siete7 segmentos transmembranales típicos de los GPCRs. Se puede observar también la octava hélice (H8). Los modelos fueron realizados por el autor de la tesis.

Cada población de NEMs expresa de manera altamente selectiva a subtipos de GPCRs (Gerfen y cols., 1990). El receptor a dopamina del tipo D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub>R) activa a proteínas G $\alpha_s$  y se expresa en las NEMs de la vía directa, mientras el receptor tipo D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>R) activa a proteínas G $\alpha_{i/o}$  y se expresa en las NEMs de la vía indirecta

(Surmeier y Kitai, 1994). Los axones colaterales de cada vía expresan D<sub>1</sub>Rs o D<sub>2</sub>Rs estableciendo una red neuronal específica entre ambas poblaciones de NEMs (Gerfen y cols., 1990, Surmeier y Kitai, 1994, Taverna y cols., 2008). Además de la regulación dopaminérgica, la actividad de las NEMs es modulada intrínsecamente por la adenosina (AD), y extrínsecamente por el sistema histaminérgico.

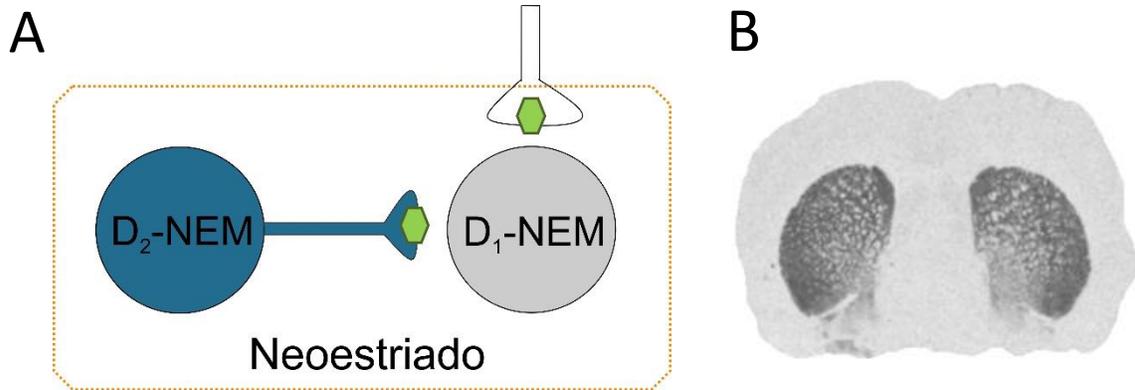
### 1.3 Sistema adenosinérgico, expresión y funcionalidad de los receptores a adenosina A<sub>2A</sub> en el neostriado.

La adenosina es un nucleósido purinérgico compuesto de una molécula de adenina unida a una molécula de ribosa y se sintetiza en el espacio sináptico por acción de ectonucleotidasas (Snyder, 1985). Estas enzimas realizan una triple desfosforilación del trifosfato de adenosina (ATP), dando como resultado la adenosina. El ATP se encuentra en alta concentración en las vesículas sinápticas, y en consecuencia es co-liberado con varios neurotransmisores, incluyendo noradrenalina (Sperlágha y cols., 1997), acetilcolina (Poelchen y cols., 2001), y GABA (Jo y Role, 2002). En el neostriado, la adenosina ejerce sus efectos funcionales mediante la activación de los receptores A<sub>1</sub> (A<sub>1</sub>R) y A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R).

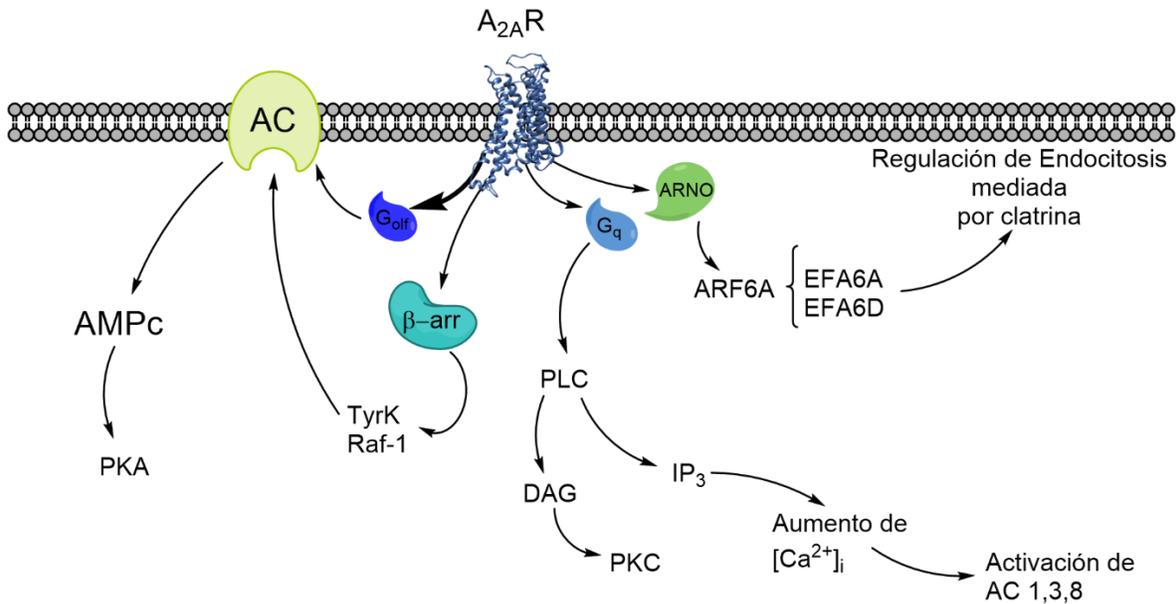
El STR es la región del SNC con mayor expresión del A<sub>2A</sub>R, localizado en los cuerpos y terminales de las NEMs de la vía estriado-palidal, donde modula intrínsecamente la transmisión sináptica GABAérgica (Schiffmann y cols., 2007), así como en las terminales cortico-estriatales que inervan a las NEMs de la vía directa, donde regula la transmisión glutamatérgica (Quiroz y cols., 2009; Figura 3).

En el STR, el A<sub>2A</sub>R canónicamente activa a proteínas G $\alpha_{\text{off}}$  (Corvol y cols., 2001), que aumentan la formación del 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) por estimulación de ciclasas de adenilato (ACs). Estructuralmente, el A<sub>2A</sub>R posee un extremo carboxilo más largo que los demás GPCRs (~122 aa *versus* 34 del A<sub>1</sub>R, por ejemplo; Gsadtner y cols., 2005), lo que le permite interactuar con varias proteínas como como G $\alpha_q$  (Gubitzi y cols., 1996; Kirk y Richardson, 1995), ARNO (ARNO, *ARF nucleotide binding site opener*, Gsadtner y cols., 2005) y

$\beta$ -arrestinas (Zezula y Fressmuth, 2008), las cuales también forman parte de la señalización del  $A_{2A}R$  (Figura 4).



**Figura 3. Distribución de los receptores a dopamina  $D_1$  y  $D_2$  y a adenosina  $A_{2A}$  ( $A_{2A}R$ ) en el neostriado.** A. Los cuerpos de las neuronas estriado-palidales y sus colaterales expresan  $A_{2A}R$ s (hexágonos) y a dopamina  $D_2$ . El  $A_{2A}R$  también se expresa en las proyecciones cortico-estriatales que inervan a las NEMs que expresan al receptor  $D_1$  (vía estriado-nigral). B. Expresión del  $A_{2A}R$  en el neostriado de la rata, determinada por la unión del antagonista [ $^3H$ ]-ZM241385. Tomado de DeMet y Chiciz-DeMet, 2002.



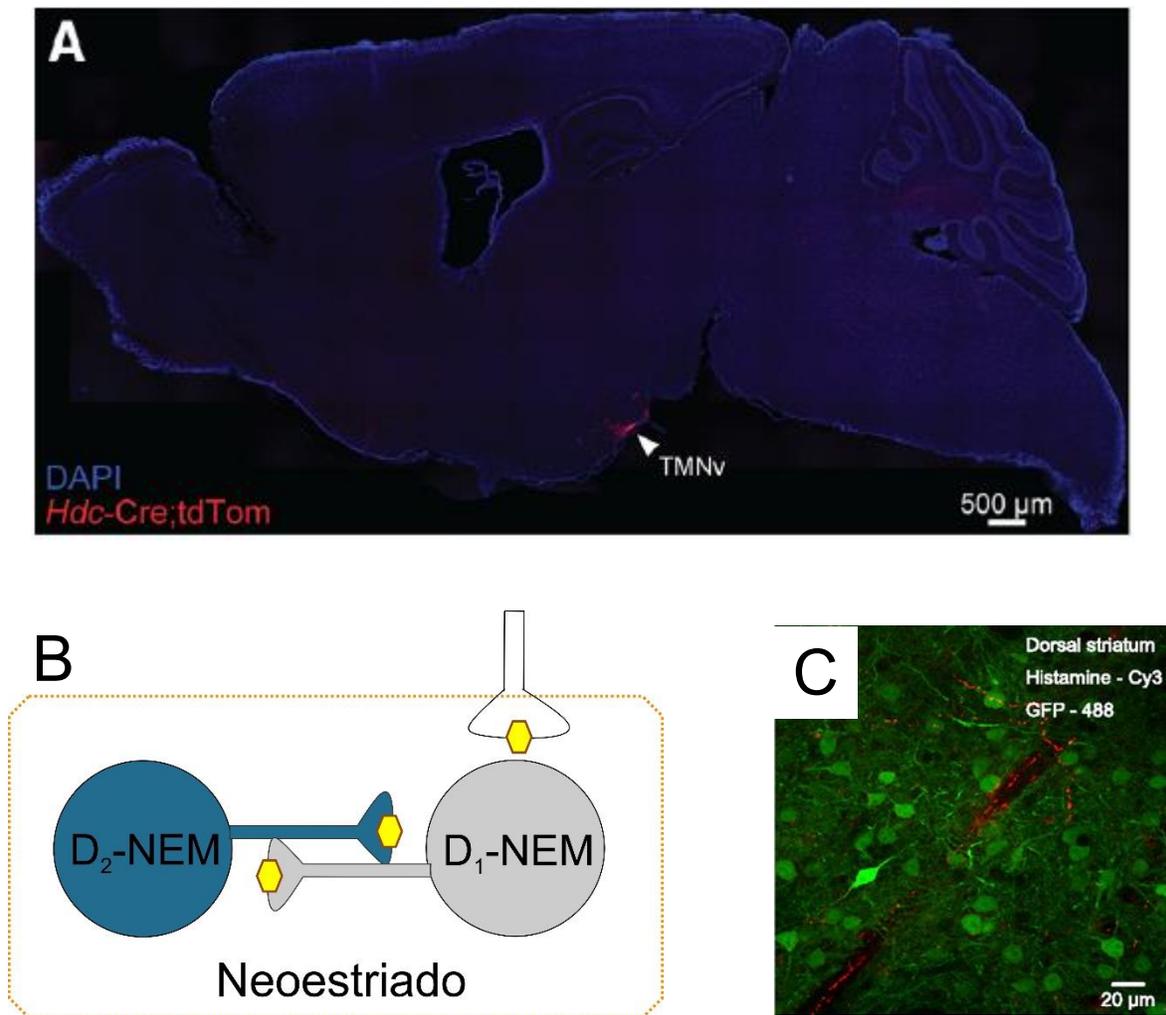
**Figura 4. Vías de señalización del  $A_{2A}R$ .** La activación de proteínas  $G_{\alpha_{olf}}$  y la formación de AMPc es la vía de señalización canónica del  $A_{2A}R$  (flecha gruesa). De manera no canónica, el  $A_{2A}R$  puede activar a varias proteínas como  $G_{\alpha_q}$ , ARNO (*ARF nucleotide binding site opener*) y  $\beta$ -arrestinas. Las fuentes de la información se mencionan en el texto.

#### 1.4 Sistema histaminérgico, expresión y funcionalidad de los receptores a histamina H<sub>3</sub> en el neoestriado.

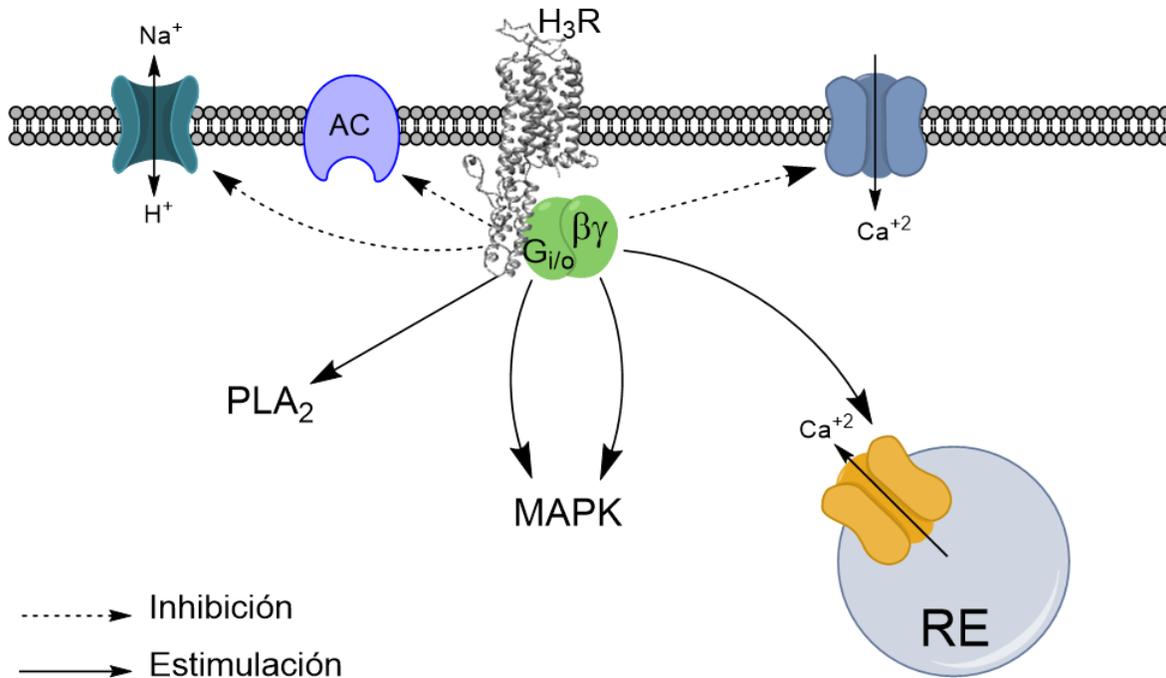
Mientras que los receptores a adenosina y a dopamina se expresan de manera diferencial en ambas poblaciones de las NEMs, los receptores a histamina (HA) se expresan en el 95% de las NEMs de la vía directa y en el 89% de las NEMs de la vía indirecta (Ryu y cols., 1994, Pillot y cols., 2002a; González-Sepúlveda, 2013; Figura 5).

La HA es sintetizada por un grupo de neuronas cuyos cuerpos celulares se localizan en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo y sus proyecciones se distribuyen en todo el SNC. La HA participa de manera importante en la modulación del balance energético, el ciclo sueño-vigilia, la regulación de la ingesta de alimentos y el mantenimiento de la temperatura corporal, entre otras funciones, mediante la activación de GPCRs denominados H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> (Nieto-Alamilla et al., 2016). De estos, el receptor H<sub>3</sub> (H<sub>3</sub>R) se expresa pre- y post-sinápticamente en el STR (Pillot y cols., 2002b).

Mediante la activación de H<sub>3</sub>Rs pre-sinápticos, la HA modula su propia síntesis y liberación, así como la liberación de otros neurotransmisores como serotonina (Schlicker y cols., 1988), acetilcolina (Clapham y Kilpatrick, 1992), dopamina (Schlicker y cols., 1993), noradrenalina (Schlicker y cols., 1989), sustancia P (Ohkubo y cols., 1995), glutamato (Dereulee y cols., 2001) y GABA (García y cols., 1997). El H<sub>3</sub>R modula la transmisión sináptica mediante la activación de diversas vías de señalización. Canónicamente el H<sub>3</sub>R activa proteínas G $\alpha_{i/o}$  (Lovenberg y cols., 1999), las cuales inhiben la actividad de las ciclasas de adenilato disminuyendo la formación de AMPc y por lo tanto reduciendo la activación de la cinasa A de proteínas, PKA. Se ha descrito que este receptor también inhibe canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje, moviliza Ca<sup>2+</sup> de depósitos intracelulares, estimula la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) e inhibe al intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Nieto-Alamilla y cols., 2016; Figura 6).



**Figura 5. Neuronas histaminérgicas y localización del H<sub>3</sub>R en el neostriado.**  
 A. Corte sagital del cerebro de rata que muestra en rojo (tdTom) la localización de las neuronas histaminérgicas del núcleo tuberomamilar ventral (TMNv). Tomado de Fujita y cols., 2017. B. El H<sub>3</sub>R se expresa en ambas poblaciones de NEMs, así como en las terminales cortico-estriatales. Se muestran sólo los H<sub>3</sub>R pre-sinápticos. C. Fibras histaminérgicas en el STR (Rojo, Cy3), entre las NEMs de la vía indirecta (Verde; GFP, Alexa fluo 488). Tomado de Ellender y cols., 2011.



**Figura 6. Vías de señalización del H<sub>3</sub>R.** La activación de proteínas G $\alpha_{i/o}$  y la inhibición de la actividad de ciclasas de adenilato son las principales vías de señalización del H<sub>3</sub>R. Otros efectos son la activación de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), y la movilización de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico (RE). AC, ciclasa de adenilato. Las fuentes de información se mencionan en el texto.

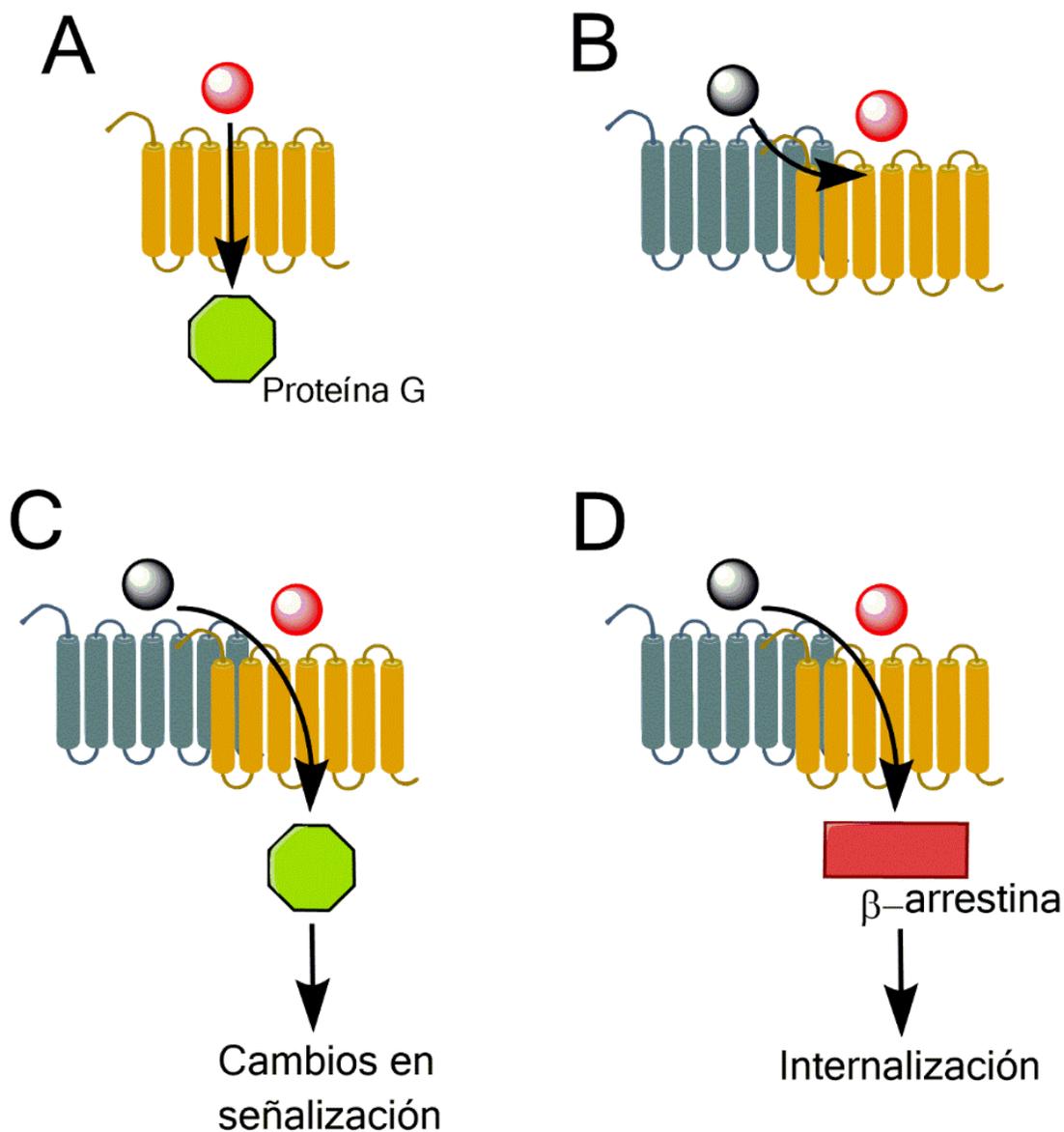
### 1.5 Interacción de los receptores A<sub>2A</sub>R y H<sub>3</sub>R con otros GPCRs

El alosterismo fue definido en 1965 por Monod, Wayman y Changeux como la capacidad de una enzima para modificar su actividad biológica de manera positiva o negativa en respuesta a la unión de un ligando en un sitio topológico distinto (sitio alostérico) al sitio catalítico (Monod y cols., 1965). Este modelo ha trascendido al área de los GPCRs, que de manera natural experimentan alosterismo, entendido como un cambio conformacional inducido por un ligando, para poder traducir una señal extracelular en una vía de señalización intracelular (Figura 7). Considerando que los GPCRs conforman la familia de receptores de membrana más importante, con 865 genes en humanos, y que son el blanco del 40% de los medicamentos disponibles, el estudio de su alosterismo se torna de gran relevancia fisiológica, terapéutica y comercial (Filmore, 2004).

Entre los varios tipos de alosterismo descritos para los GPCRs, el alosterismo por formación de heterodímeros, propuesto hace más de dos décadas, se ha aceptado recientemente como un mecanismo fisiológico de regulación de la actividad de los GPCRs y por lo tanto, de modulación de la actividad celular (Foster y Conn, 2017). Entre estos complejos proteicos destacan aquellos cuya función repercute en la actividad neuronal, como los formados entre receptores a dopamina y a adenosina ( $D_2$ - $A_{2A}$  y  $D_1$ - $A_1$ ) o a histamina ( $D_2/D_1$ - $H_3$ ), entre otros.

Los dímeros formados por estos receptores tienen un importante papel fisiológico en el neostriado, núcleo donde se expresan abundantemente y su participación es crucial para el correcto funcionamiento de todo el sistema de los ganglios basales. En el neostriado, los receptores  $A_{2A}$ ,  $H_3$  y  $D_2$  co-existen en las NEMs de la vía indirecta, mientras que los receptores  $H_3$  y  $D_1$  lo hacen en las NEMs de la vía directa. En las NEMs de la vía indirecta tanto los receptores  $A_{2A}$  como los  $H_3$  interactúan con los receptores  $D_2$ , mientras que en las NEMs de la vía directa los receptores  $D_1$  y  $H_3$  también pueden formar heterodímeros. Estas interacciones son unidireccionales, en las que los receptores a dopamina  $D_1$  y  $D_2$  experimentan disminución en su funcionalidad y en la afinidad por sus agonistas (Ellenbroek y cols., 2013; Hillion y cols., 2002).

Sin embargo, aunque los receptores  $A_{2A}$  y  $H_3$  se co-expresan en las NEMs de la vía indirecta y en las terminales cortico-estriatales y de manera similar a los receptores  $D_1$  y  $H_3$  tienen vías de señalizaciones antagonicas, la posibilidad de una interacción física y molecular entre ellos no había sido explorada.



**Figura 7. Modelo de alosterismo en un GPCR y en un dímero de GPCRs.** **A.** De manera natural, los GPCRs experimentan alosterismo al ser activados y activan a la proteína G correspondiente. Un agonista se une al sitio de unión del receptor y genera en él cambios conformacionales que se traducen intracelularmente en la activación de la proteína G. **B.** Cuando se forma un heterodímero de GPCRs, la unión de un ligando al segundo receptor (en gris) puede modular positiva o negativamente la afinidad del primer receptor por sus ligandos. **C.** La activación del segundo receptor puede también modular la eficacia y la potencia con que el primer receptor activa proteínas G, induciendo cambios en el perfil de señalización. **D.** Estos cambios pueden extenderse a otras proteínas, como las  $\beta$ -arrestinas, produciendo cambios en la internalización de los receptores involucrados en la interacción.

## 2. Justificación

Los ganglios basales forman un sistema de núcleos neuronales que modula el control motor e integra procesos cognitivos y sensoriales. En este sistema, el neostriado recibe la mayor cantidad de aferentes sinápticas, originadas en la corteza cerebral, el tálamo y la sustancia negra compacta.

Las neuronas espinosas medianas (NEMs) conforman la mayoría de las células neuronales del núcleo y se dividen en dos poblaciones que generan la vía directa y la vía indirecta de los ganglios basales. Estas neuronas están bajo la modulación de receptores acoplados a proteínas G como los receptores a dopamina, a adenosina y a histamina.

En el neostriado, los receptores  $A_{2A}$  y  $H_3$  se co-expresan en las NEMs que forman la vía indirecta de ganglios basales y en las terminales cortico-estriatales que inervan a las NEMs que forman la vía directa de ganglios basales. Tanto el  $A_{2A}R$  como el  $H_3R$  modulan la liberación de GABA y glutamato, ya sea de manera individual o mediante su interacción con receptores a dopamina. Sin embargo, la posibilidad de que el  $A_{2A}R$  y el  $H_3R$  formen un heterodímero en el estriado, no había sido estudiada.

### **3. Hipótesis**

Los receptores a adenosina  $A_{2A}$  y a histamina  $H_3$  forman un heterodímero en un sistema de expresión heterólogo y en el neocórtex de la rata, con propiedades farmacológicas distintas a las presentadas por los monómeros.

#### **4. Objetivo general**

Determinar si existe una interacción molecular entre los receptores a adenosina A<sub>2A</sub> y a histamina H<sub>3</sub> en un sistema de expresión heterólogo y en el neocórtex de la rata.

##### **4.1 Objetivos particulares**

1. Determinar la posible interacción física entre los receptores A<sub>2A</sub> y H<sub>3</sub> por ensayos de co-inmunoprecipitación en el neocórtex de la rata y en células HEK-293T co-transfectadas.
2. Determinar si la activación del A<sub>2A</sub>R o del H<sub>3</sub>R modifica las propiedades farmacológicas del segundo receptor en el neocórtex de la rata, mediante ensayos de unión de radioligando
3. Determinar si la activación del A<sub>2A</sub>R o del H<sub>3</sub>R modifica las propiedades farmacológicas y funcionales del segundo receptor en células HEK-293T, mediante ensayos de complementación funcional y de formación de AMPc.
4. Confirmar la interacción A<sub>2A</sub>R y H<sub>3</sub>R por medio de técnicas de fluorescencia (Complementación Funcional Bimolecular) en células HEK-293T.
5. Evaluar la interface de interacción entre los receptores A<sub>2A</sub> y H<sub>3</sub> mediante química computacional.

## 5. Metodología

### 5.1 Generación de construcciones plasmídicas

Los receptores A<sub>2A</sub> o H<sub>3</sub> truncos se generaron por amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 1. Después de la amplificación y restricción con las enzimas HindIII y BamHI, los receptores A<sub>2A</sub> y H<sub>3</sub> truncos se subclonaron en el plásmido pcDNA3.1 que contenía las proteínas quiméricas G $\alpha_{qs4}$  o G $\alpha_{qi4}$ . Ambos receptores fueron marcados con una bandera de hemaglutinina (3xHA). Para generar a los receptores marcados con 3xHA, el A<sub>2A</sub>R y el H<sub>3</sub>R se amplificaron desde los nucleótidos 377 y 458, respectivamente, hacia el extremo amino. El fragmento 3xHA se amplificó a partir de un plásmido que contiene la secuencia codificante para el receptor a histamina H<sub>4</sub> marcado con dicha bandera (3xHA-H<sub>4</sub>R en pcDNA3.1, *cDNA Resource Center*, St. Louis, MO). Los fragmentos de DNA amplificados (3xHA-A<sub>2A</sub>R377 o 3xHA-H<sub>3</sub>R458) fueron re-introducidos en el vector pcDNA3.1-H<sub>3</sub>R o pcDNA3.1-A<sub>2A</sub>R para obtener los receptores marcados completos. La inserción y orientación de los fragmentos amplificados fue verificada por secuenciación automática realizada en la FES Iztacala, UNAM (Los Reyes Iztacala, Estado de México, México).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos empleados en la generación de los receptores A<sub>2A</sub> y H<sub>3</sub> truncos.

---

Fwd_3xHA + HindIII	5'-AAAAAGCTTATGTACCCATACGATGTTCC-3'
Rev_3xHA-A <sub>2A</sub> R-302 + BamHI	5'-AAAGGATCCGATCTTGCGGAAGG-3'
Rev_3xHA-H <sub>3</sub> R-427 + BamHI	5'-AAAGGATCCCAGCAGCTTGGTG-3'
Rev_3xHA-H <sub>3</sub> R-411 + BamHI	5'-AAGGATCCAGGGTAGAGGACAGGGTTGAC-3'
Rev_3xHA-H <sub>3</sub> R-421 + BamHI	5'-AAAGGATCCCCGGCGGAAGCTGTGGTG-3'

---

## 5.2 Cultivo celular y transfección

Las células HEK-293T se cultivaron en medio DMEM con alta glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (50 UI/ml) y estreptomycin (0.1 mg/ml), en una atmosfera humidificada (5% CO<sub>2</sub> en aire) y a 37°C.

Para las transfecciones, las células fueron sembradas en placas de 6 pozos (6x10<sup>5</sup> células/pozo) y se incubaron por 24 h a 37°C en una mezcla de 5% CO<sub>2</sub>/aire. Al día siguiente, 10 µl de X-tremeGENE se mezclaron con 500 µl de medio Optimem y la mezcla se incubó a temperatura ambiente. Después de 5 min se añadió el plásmido en una relación 1 µg de ADN por 5 µg de X-tremeGENE. Para los ensayos de AMPc, una mezcla de ADN y del plásmido Glosensor AMPc (relación 1:2) fue añadida a la solución Optimem/X-tremeGENE. Cuando los plásmidos que contienen al A<sub>2</sub>AR o H<sub>3</sub>R se transfectaron de manera individual, la cantidad de ADN se preservó añadiendo el vector pcDNA3.1 vacío.

La mezcla de transfección se incubó por 20 min a temperatura ambiente antes de ser añadida a las células, las cuales fueron posteriormente incubadas por 24 h a 37°C en una atmosfera humidificada (5% CO<sub>2</sub>/aire).

Para los ensayos de co-inmunoprecipitación, las células HEK-293T se transfectaron usando el método de polietilenimina (PEI, 1 mg/ml) al alcanzar un 80% de confluencia. Brevemente, una mezcla de ADN/PEI (relación 1:10) se incubó por 30 min a temperatura ambiente antes de ser añadida a las células. Después de incubar por 30 min a 37°C bajo atmosfera húmeda (5% CO<sub>2</sub>/aire), las células fueron suplementadas con 10% de SFB y la incubación se continuó por 24 h bajo la misma condición.

## 5.3 Ensayos de formación de AMPc

Las células HEK-293T transfectadas con los receptores 3xHA-A<sub>2</sub>AR, 3xHA-H<sub>3</sub>R o una mezcla de ambos (1 µg del plásmido para cada uno) en combinación con el

plásmido Glosensor AMPc, se sembraron en placas blancas de bajo volumen de 284 pozos (25,000 células/pozo en 7.5  $\mu$ l de medio), y se incubaron con medio Glo-equilibrium (Promega, 7.5  $\mu$ l/pozo) por 90 min a temperatura ambiente. Los fármacos a estudiar se añadieron en un volumen de 5  $\mu$ l (4x en solución HBSS; *Hans Balanced Salt Solution*; composición en mM: NaCl 140, KCl 5; CaCl<sub>2</sub> 1; MgSO<sub>4</sub> 0.4; MgCl<sub>2</sub> 0.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4, D-glucosa 6, NaHCO<sub>3</sub> 4) y la luminiscencia del AMPc endógeno se determinó en tiempo real en un aparato Flexstation 3 (Molecular Devices).

#### 5.4 Ensayos de movilización de calcio

Las células HEK-293T transfectadas con 1  $\mu$ g de ADN total se sembraron (2.5x10<sup>4</sup> células/pozo en 25  $\mu$ l de medio) en una placa de 384 pozos con fondo claro y se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, cubiertas con una placa de Areaseal. Las células fueron cargadas con 25  $\mu$ l del indicador FLIPR Ca<sup>2+</sup> (Molecular Devices) e incubadas por 1 h a 37°C. Los agonistas se añadieron en un volumen de 20  $\mu$ l y la movilización de Ca<sup>2+</sup> se midió en tiempo real por 2 min en un equipo Flexstation 3 (Molecular Devices). Los datos obtenidos fueron analizados como se describe en detalle en van Rijn y cols. (2013).

#### 5.5 Preparación de sinaptosomas del neocórtex de la rata

Los animales (ratas Wistar macho, 250-300 g; 3-5 animales por experimento) fueron decapitados y el cerebro fue rápidamente removido del cráneo para ser colocado en una placa de metal sobre hielo. El neocórtex se disecó usando fórceps y el tejido se colocó en 5 ml de una solución de sacarosa (0.32 M) conteniendo 10 mM de Hepes, 1 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA) y 1 mM de EDTA (pH 7.4 con NaOH). El tejido se homogenizó con un vástago de teflón (400 rpm), se centrifugó (1000xg, 10 min, 4°C) y el sobrenadante fue colectado para ser centrifugado (14,000xg, 12 min, 4°C). La pastilla se resuspendió en 5 ml de una solución de 45% de Percoll en solución Krebs-Henseleit-Ringer (en mM: NaCl 140, Hepes 10, D-

glucosa 5, KCl 4.7, EDTA 1, pH 7.4 con NaOH). Después de centrifugar (2 min, 14,000xg, 4°C), la porción superior se colectó y se llevó a 20 ml con solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH; en mM: NaCl 113, NaHCO<sub>3</sub> 25, Hepes 20, D-glucosa 15, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, pH 7.4 con NaOH). La suspensión se centrifugó (20,000xg, 20 min, 4 °C) y la pastilla (sinaptosomas) fue resuspendida en solución KRH o la solución correspondiente.

## 5.6 Ensayos de unión de radioligando en membranas estriatales

Los sinaptosomas del neostriado se resuspendieron en solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4) y se incubaron por 20 min a 4°C antes de centrifugar (20 min, 20,000xg, 4°C). La pastilla (membranas sinaptosomales) fue resuspendida en 1 ml de solución KRH a la cual se le añadió desaminasa de adenosina (2 U/ml) y se incubaron por 30 min a 37°C. Posteriormente, se añadieron 20 ml de solución KRH fría y se centrifugó (20 min, 20,000xg, 4°C). La pastilla (membranas) se resuspendió en solución de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7.4).

Para el ensayo de unión, alícuotas de las membranas sinaptosomales (~40 µg de proteína en 40 µl de solución) fueron incubadas con 10 µl de concentraciones crecientes de CGS-21680 o RAMH (20x) y 50 µl de una concentración fija de [<sup>3</sup>H]-CGS-21680 (48 nM) o [<sup>3</sup>H]-NMHA (8 nM), respectivamente. Después de 1 h de incubación a 30°C ([<sup>3</sup>H]-NMHA) o 2 h a 25°C ([<sup>3</sup>H]-CGS-21680), la reacción fue detenida por filtración rápida a través de papel Whatman GF/B tratado (2 h) con 0.3 % polietilenimina (PEI). Los filtros se lavaron 3 veces con 1 ml de solución Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) a 4°C, se transfirieron a viales de plástico, se añadieron 4 ml de solución de centelleo y el contenido de tritio se determinó por centellometría.

## 5.7 Ensayos de co-inmunoprecipitación

Estos ensayos se realizaron tanto en sinaptosomas como en células HEK-293T. Los sinaptosomas estriatales fueron obtenidos como se describió antes y se re-suspendieron en 1 ml de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, SDS 0.05%, inhibidor de proteasas 1  $\mu$ l/ml). Las células HEK-293T fueron disgregadas en solución RIPA. Para ambas preparaciones, la proteína fue extraída por sonicación (3 ciclos, 30 s, 8 kHz). Las muestras se centrifugaron (20 min, 6,000xg) y se colectó el sobrenadante que contiene el extracto proteico, al cual se le realizó un pre-aclaramiento por incubación (1 h, 4°C) con 10  $\mu$ l de perlas A/G Plus bajo agitación rotatoria. Las perlas se precipitaron (2 min, 6000xg) y el sobrenadante fue empleado para el ensayo. La proteína fue cuantificada por el método de BCA. Brevemente, concentraciones crecientes de BSA (0.025 a 2 mg/ml, 8 concentraciones) fueron usadas como curva de referencia, y a cada punto de la curva y a cada muestra (25  $\mu$ l/muestra por duplicado) se le añadieron 200  $\mu$ l de la mezcla del ensayo. La cantidad de proteína se determinó por absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

Los extractos proteicos (500  $\mu$ g de proteína de sinaptosomas estriatales o 200  $\mu$ g de proteína de las células HEK-293T) se incubaron con 2  $\mu$ g de los anticuerpos primarios (anti-A<sub>2A</sub>R Abcam, cat. 3461, anti-HA, Cell Signaling, cat. C29F4, anti-H<sub>3</sub>R, Abcam, cat. ab84468, dilución 1:100) junto con las perlas A/G Plus (Santa Cruz Biotechnology, relación 1:5 anticuerpo:perlas) por 16 h a 4°C bajo agitación rotatoria. Como control negativo se usaron anticuerpos contra la proteína CD-81 (Santa Cruz Biotechnology, cat. sc-70803) o el receptor a dopamina D<sub>2</sub> (Santa Cruz Biotechnology, cat. sc-5303) para los sinaptosomas estriatales o las células, respectivamente. El complejo perla-anticuerpo se precipitó (2 min, 6000xg) y una alícuota de 30  $\mu$ l del sobrenadante se usó como control de carga. En ambos extractos proteicos, 30  $\mu$ l de la proteína total se utilizaron como control de carga (*input*).

El complejo se disoció por 60 min a 48°C en solución de carga (10%  $\beta$ -mercaptoetanol y 50% solución Laemmli en H<sub>2</sub>O) con agitación en intervalos por

1 h (900 rpm, 30 s/min), y se separó por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% (20 min a 80 V y 65 min a 120 V). La transferencia semi-seca se realizó a 15 V por 95 min. Las membranas se bloquearon con leche libre de grasas al 5% diluida en solución TBS-Twin 0.05% (16 h, 4°C). Después de los lavados, la membrana fue incubada por 16 h a 4°C en 5 ml de solución TBS-Twin 0.05% conteniendo 5% de BSA y el anticuerpo de transferencia (anti-A<sub>2A</sub>R, anti-HA o anti-H<sub>3</sub>R, dilución 1:1000).

Posteriormente, las membranas se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti-conejo conjugado a la peroxidasa de rábano, Invitrogen, cat. 65-6120, dilución 1:5000 en leche sin grasa al 5% en TBS-Twin 0.05%). Para los controles de carga, las membranas se incubaron por 1 h con anticuerpos contra  $\beta$ -tubulina (cat. 322600) o  $\alpha$ -actina (cat. A5228; dilución 1:5000 en TBST 0.05%). Después de lavar, las membranas se incubaron por 1 h con el anticuerpo secundario ( $\alpha$ -ratón, Santa Cruz, sc-2005) diluido en TBST 0.05%. Las imágenes de las membranas se obtuvieron por quimioluminiscencia en una placa de rayos X (Kodak).

## 5.8 Ensayos de modelado, acople proteína-proteína y dinámica molecular

El modelo del receptor A<sub>2A</sub> humano (hA<sub>2A</sub>R) en conformación activa se construyó con el programa Modeller, utilizando como molde el cristal del hA<sub>2A</sub>R unido al agonista CGS-21680 (PDB: 4UHR). Para seleccionar el mejor modelo homólogo del receptor se empleó el criterio de menor energía (kcal/mol), considerado como el más favorable termodinámicamente.

Para generar el modelo del H<sub>3</sub>R, la secuencia de amino ácidos del receptor se sometió al servidor I-tasser de donde se obtuvo el modelo del H<sub>3</sub>R, usando como molde los cristales del receptor a rodopsina (PDB: 2Z1Y), del A<sub>2A</sub>R (PDB: 3QAK), del receptor muscarínico M<sub>3</sub> (PDB: 4DAJ), del receptor a serotonina 5-HT<sub>1B</sub> (PDB: 4IAQ), del receptor muscarínico M<sub>4</sub> (PDB: 5DSG) y del receptor a cannabinoides CB<sub>1</sub> (PDB: 5TGZ).

Las estructuras de ambos receptores se refinaron usando el servidor Modrefiner (Xu y Zhang, 2011) y dinámica molecular por 1  $\mu$ s. La calidad de las estructuras se evaluó mediante gráficas de Ramachandran obtenidas del servidor MolProbity (Chen y cols., 2010). Una vez confirmada la correcta estructura de los receptores, éstos se sometieron al análisis de acople molecular (*docking*) proteína-proteína en el servidor Cluspro bajo técnica ciega, obteniéndose 50 complejos. A partir de este resultado se seleccionó la interacción más frecuente y se procedió a realizar el *docking* dirigido a las regiones de cada receptor que interactuaron con mayor frecuencia, utilizando el servicio HADDOCK (van Zundert y cols., 2016), de donde se obtuvieron 5 complejos, seleccionándose el más favorable con base en el criterio de la menor energía. El complejo se embebió en una membrana lipídica de fosfatidilcolina y se aplicó dinámica molecular por 1  $\mu$ s. El estudio de las interacciones entre los receptores se realizó sometiendo el complejo A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R al servidor Cocomaps (Vangone y cols., 2011) y por análisis manual. Los residuos con distancia de interacción  $\leq 5$  Å se consideraron residuos interactuantes. La visualización de la proteína se realizó con los programas *Visual Molecular Dynamics* (Humphrey y cols., 1996) y *Chimera* (Pettersen y cols., 2004).

## 5.9 Ensayo de Complementación Fluorescente Bimolecular (BiFC)

Cubreobjetos de vidrio de 15 mm<sup>2</sup> fueron colocados individualmente en cajas de 6 pozos para ser tratados con poli-L-lisina por 10 min. Sobre los cubreobjetos se sembraron  $1.5 \times 10^5$  células HEK-293T, las cuales se transfectaron con Lipofectamina con plásmidos pcDNA3.1+ que contenían las secuencias codificantes del A<sub>2A</sub>R unido a la mitad carboxilo de la proteína Venus (A<sub>2A</sub>R-Vc) o bien el H<sub>3</sub>R unido a la mitad amino de la proteína Venus (H<sub>3</sub>R-Vn). Como controles positivo y negativo se emplearon los receptores a dopamina D<sub>2</sub> y D<sub>1</sub>, respectivamente, unidos a Vn (D<sub>2</sub>R-Vn y D<sub>1</sub>R-Vn).

La transfección se realizó diluyendo 2  $\mu$ l de Lipofectamina 2000 en 250  $\mu$ l de medio DMEM con alta glucosa. La mezcla se incubó por 5 min a temperatura ambiente antes de añadirla a 250  $\mu$ l de DMEM conteniendo 500 ng de cada plásmido, para

obtener un volumen final de 500  $\mu\text{l}$ . La co-transfección se realizó incubando cada plásmido en un vial diferente por 20 min. Las mezclas se combinaron para añadirse a los cultivos. Después de 5 h de incubación se retiró el medio de transfección y se sustituyó por medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de la solución de antibiótico-antimicótico.

La fluorescencia emitida por la complementación de la proteína Venus fue analizada por microscopía confocal. Los cubreobjetos con las células HEK-293T transfectadas fueron removidos de la caja de 6 pozos para ser colocados en una cámara para microscopía confocal. La cámara se selló con cera y se llenó con 200  $\mu\text{l}$  de PBS estéril a 37°C. Una vez colocada la cámara en el microscopio confocal, se determinó la fluorescencia excitando a la proteína Venus a 470 nm y detectando su emisión a 525 nm. Se analizaron tres cubreobjetos por transfección y se contaron 10 células por cada cubreobjeto. La fluorescencia total y de fondo se cuantificaron con el programa imageJ (Schindelin y cols., 2015). La fluorescencia integrada (FI) se calculó usando la fórmula:

$$FI = DI - (AC \times Pff)$$

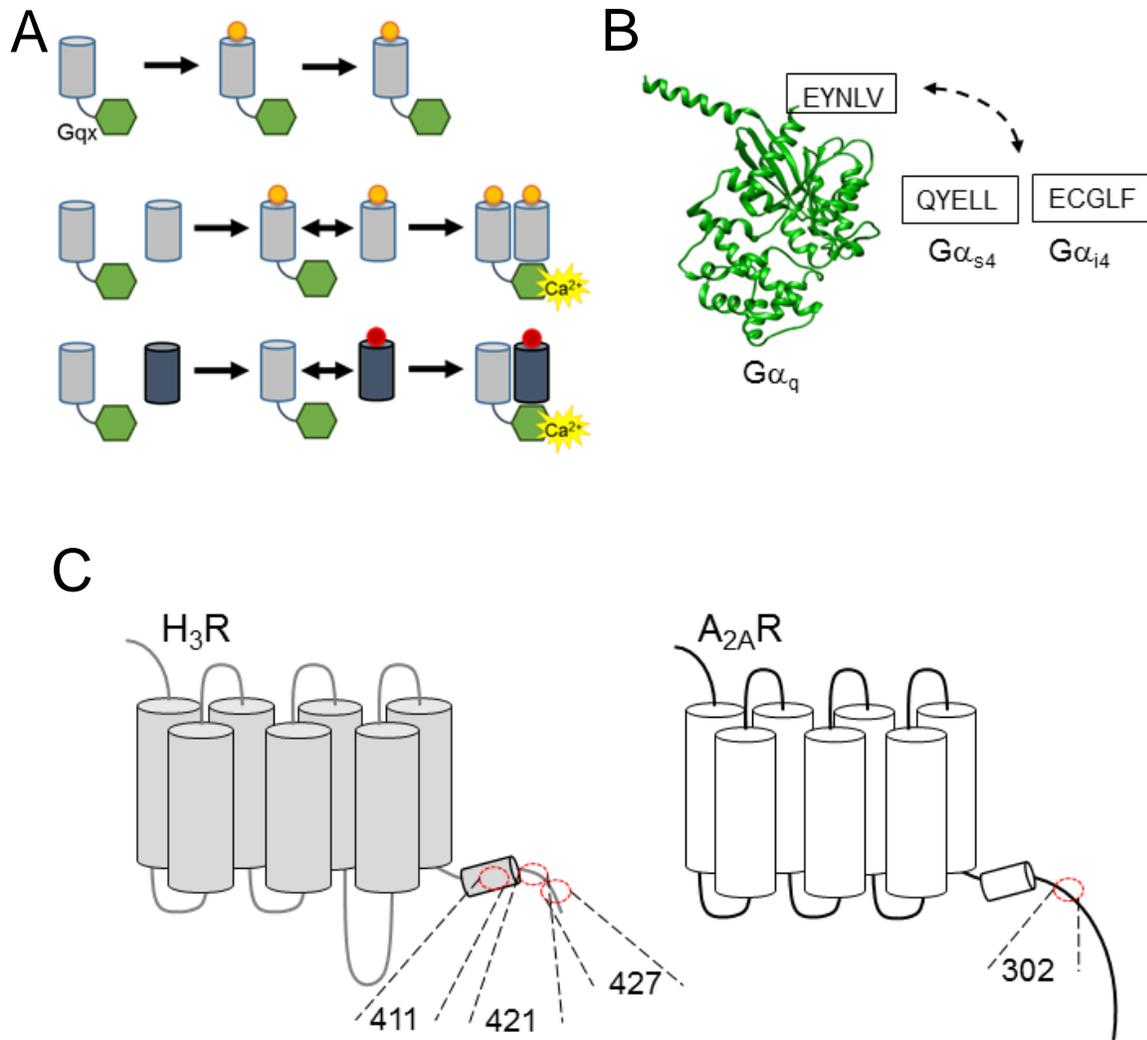
Donde DI es la Densidad integrada, AC es el área celular y Pff es el promedio de la fluorescencia de fondo.

## 6. Resultados

### 6.1 Los receptores A<sub>2A</sub> y H<sub>3</sub> experimentan complementación funcional en células HEK-293T

Como primer abordaje para explorar la potencial interacción A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R, utilizamos ensayos de complementación funcional. Se ha reportado que GPCRs truncados en proximidad de la hélice 8 y unidos a una proteína G quimérica (G $\alpha_{qs}$  o G $\alpha_{qi}$ ) por el extremo C-terminal son incapaces de activar proteínas G; sin embargo, cuando se encuentran en proximidad con un receptor nativo, este puede activar a las proteínas G quiméricas unidas al receptor no funcional e inducir la activación de la fosfolipasa C, la formación de 1,4,5-trifosfato de inositol (1,4,5-IP<sub>3</sub>) y la subsecuente movilización de Ca<sup>2+</sup> desde depósitos intracelulares. Este efecto sugiere proximidad física de ambos receptores y por lo tanto, dimerización (Han y cols., 2009; van Rijn y cols., 2013; Figura 8A).

Para estos experimentos se generaron receptores no funcionales a los cuales se truncó el extremo carboxilo terminal. El A<sub>2A</sub>R se truncó de 412 a 302 amino ácidos (A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>) y el C-terminal del H<sub>3</sub>R de 445 amino ácidos se truncó para generar receptores de 427, 421 o 411 residuos (H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>, H<sub>3</sub>R<sub>421</sub>, H<sub>3</sub>R<sub>411</sub>; Figura 8B). Cada uno de los receptores trancos fue unido a proteínas G quiméricas, conformadas por una proteína G $\alpha_q$  en la cual los residuos EYNLV del extremo C-terminal fueron sustituidos por los amino ácidos QYELL de la proteína G $\alpha_{s4}$  o ECGLF de la proteína G $\alpha_{i4}$ , generando las proteínas G $\alpha_{qs4}$  y G $\alpha_{qi4}$  (Figura 8C).



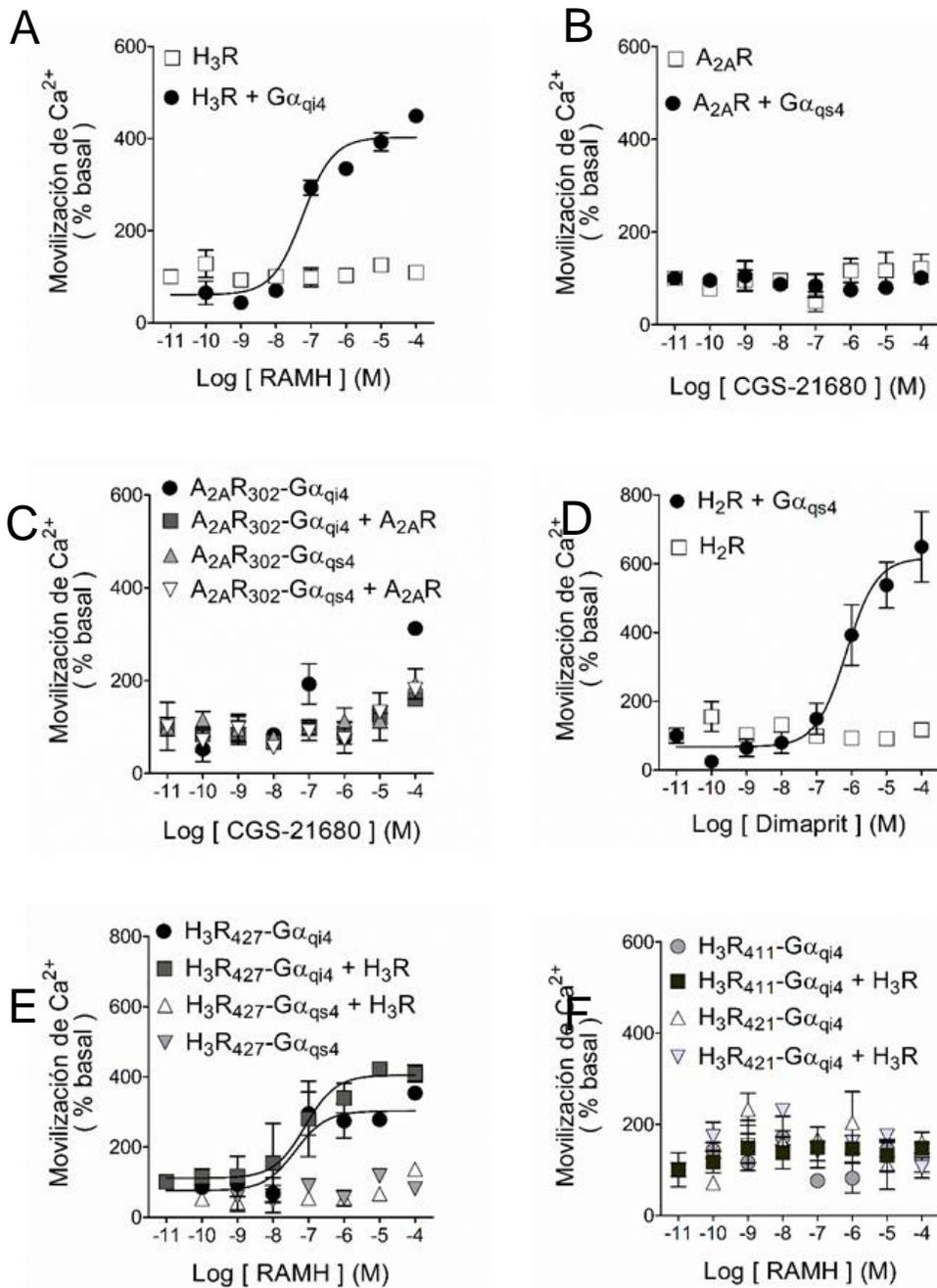
**Figura 8. Fundamentos del ensayo de complementación funcional.** **A.** Un receptor trunco (cilindro) unido a una proteína G quimérica ( $G\alpha_{qs4}$  o  $G\alpha_{qi4}$ ; hexágono) por su extremo carboxilo terminal, es incapaz de inducir movilización de  $Ca^{2+}$ . Cuando el receptor quimérico se co-expresa con un receptor nativo, la formación de homómeros o heterómeros (cilindro azul) permite observar la movilización de  $Ca^{2+}$  al activar al receptor nativo, resultado indicativo de la formación de dímeros. **B.** Los receptores  $H_3$  y  $A_{2A}$  fueron truncados en los sitios indicados para generar receptores no funcionales. **C.** El extremo carboxilo de la proteína  $G\alpha_q$  (EYNLV) fue remplazado por los extremos carboxilo de las proteínas  $G\alpha_{s4}$  o  $G\alpha_{i4}$ , generando las proteínas quiméricas  $G\alpha_{qs4}$  (QYELL) y  $G\alpha_{qi4}$  (ECGLF).

Reportes previos sugieren que la activación del H<sub>3</sub>R expresado en células CHOK-1 o en cultivos primarios de neuronas estriatales induce movilización de Ca<sup>2+</sup> (Cogé y cols., 2001; Rivera-Ramirez y cols., 2016). Por otra parte, el A<sub>2A</sub>R puede favorecer la entrada de Ca<sup>2+</sup> modulando canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (Kirk y Richardson, 1995; Gubitzy y cols., 1996). En células HEK293T transfectadas con el H<sub>3</sub>R la activación del receptor por el agonista RAMH no indujo movilización de Ca<sup>2+</sup> y este efecto sólo se observó cuando el H<sub>3</sub>R se co-transfectó con la proteína quimérica G $\alpha_{qi4}$ , demostrando la capacidad de receptor para señalizar mediante esta proteína (Figura 9A). En contraste, la activación del A<sub>2A</sub>R nativo, expresado en la misma línea celular, por el agonista CGS-21680 no indujo movilización de Ca<sup>2+</sup> y este efecto tampoco se observó cuando se co-expresó al receptor con la proteína G $\alpha_{qs4}$ , sugiriendo que el A<sub>2A</sub>R es incapaz de activar a las proteínas G quiméricas (Figura 9B).

En congruencia con este resultado, la activación de los receptores truncos A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qs4}$  y A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qi4}$  no indujo movilización de Ca<sup>2+</sup> y su co-transfección con el A<sub>2A</sub>R nativo no produjo complementación funcional (Figura 9C). Para corroborar que la proteína quimérica G $\alpha_{qs4}$  funcionaba correctamente, se transfectaron células HEK-293T con el receptor a histamina H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>R) y la proteína G $\alpha_{qs4}$ . La activación del H<sub>2</sub>R por el agonista dimaprit resultó en una clara señal de Ca<sup>2+</sup>, confirmando la integridad y funcionamiento de la proteína G $\alpha_{qs4}$  y la incapacidad del A<sub>2A</sub>R para activar a las proteínas quiméricas (Figura 9D).

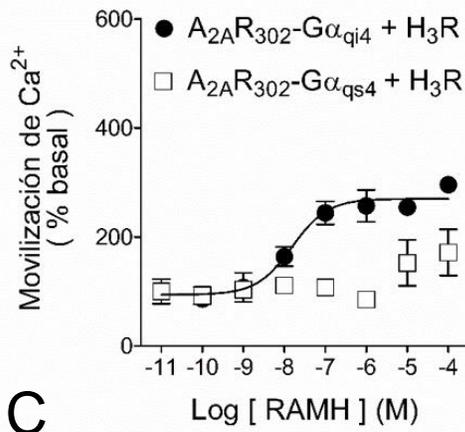
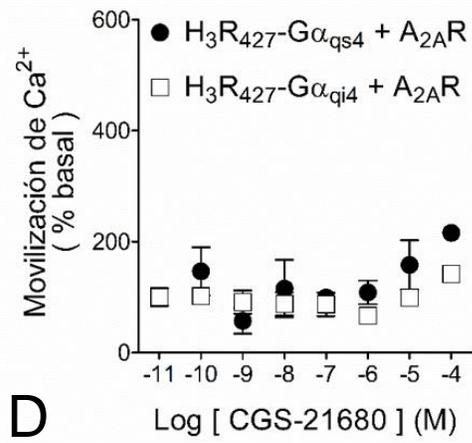
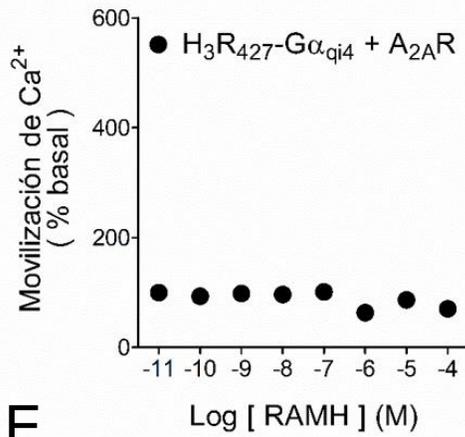
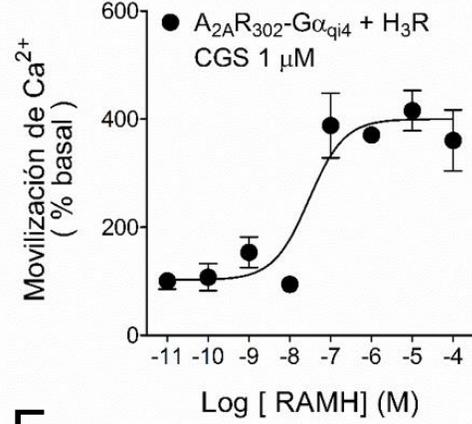
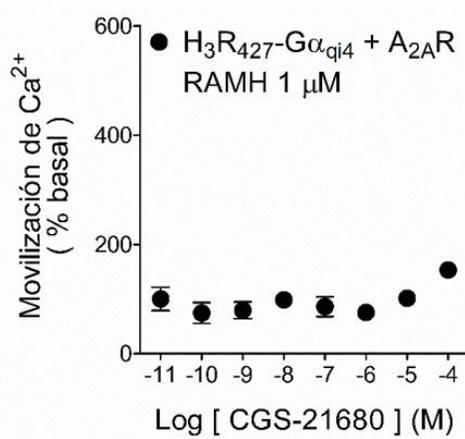
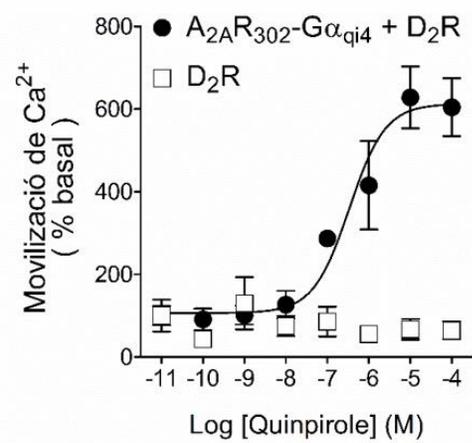
En la construcción H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$ , el H<sub>3</sub>R fusionado con la proteína G $\alpha_{qi4}$  fue truncado de manera tal que indujera una baja movilización de Ca<sup>2+</sup> al ser transfectado de manera aislada, pero que dicha señalización aumentara al co-expresarlo con el H<sub>3</sub>R nativo. Sin embargo, la transfección de células HEK-293T con el H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$  o con la combinación H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$  + H<sub>3</sub>R resultó en respuestas similares (Figura 9E). Para corregir la señalización observada con el H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$  se generaron dos versiones más cortas del H<sub>3</sub>R, de 421 y 411 amino ácidos, que se fusionaron con la proteína G $\alpha_{qi4}$  (H<sub>3</sub>R<sub>421</sub>-G $\alpha_{qi4}$  y H<sub>3</sub>R<sub>411</sub>-G $\alpha_{qi4}$ ). Por sí solos los receptores H<sub>3</sub>R<sub>421</sub>-G $\alpha_{qi4}$  y H<sub>3</sub>R<sub>411</sub>-G $\alpha_{qi4}$  no indujeron señalización al ser

activados con el agonista RAMH y tampoco experimentaron complementación funcional al ser co-expresados con el H<sub>3</sub>R nativo, indicando que estas construcciones no poseen la longitud necesaria para que la proteína G $\alpha_{qi4}$  sea activada por el receptor nativo (Figura 9F). Considerando estos resultados negativos, los siguientes experimentos fueron realizados con el H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$ .



**Figura 9. Evaluación de la posible dimerización A<sub>2A</sub>R-H<sub>3</sub>R por ensayos de complementación funcional.** **A.** La activación del H<sub>3</sub>R con el agonista RAMH indujo la movilización de Ca<sup>2+</sup> cuando se co-expresó con la proteína quimérica G $\alpha_{qi4}$ , pero no cuando se transfectó solo. **B.** La activación del A<sub>2A</sub>R con el agonista CGS-21680 no indujo movilización de Ca<sup>2+</sup>, ya sea expresado solo o al ser co-transfectado con la proteína quimérica G $\alpha_{qs4}$ . **C.** No se observó complementación funcional por homodimerización del A<sub>2A</sub>R nativo con el receptor trunco A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub> fusionado a G $\alpha_{qs4}$  (A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qs4}$ ) o a G $\alpha_{qi4}$  (A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qi4}$ ). **D.** La activación del receptor a histamina H<sub>2</sub>, que se acopla a proteínas G $\alpha_s$ , no indujo movilización de Ca<sup>2+</sup> cuando se transfectó solo, pero lo hizo cuando se co-expresó con la proteína quimérica G $\alpha_{qs}$ , demostrando la funcionalidad de la proteína quimérica. **E.** La activación del receptor trunco H<sub>3</sub>R<sub>427</sub> fusionado a G $\alpha_{qi4}$  (H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$ ) indujo movilización de Ca<sup>2+</sup> por sí solo, y la homodimerización con el H<sub>3</sub>R nativo no modificó dicha respuesta. No se observó movilización en respuesta a la activación del H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qs4}$  cuando este se co-expresó con el H<sub>3</sub>R nativo. **F.** Las versiones truncas del H<sub>3</sub>R de 421 y 411 residuos fueron incapaces de movilizar Ca<sup>2+</sup> y no se observó complementación funcional por homodimerización. En todas las gráficas los valores son los promedios  $\pm$  error estándar (ESM) de 3 replicados de un experimento representativo. El análisis cuantitativo se muestra en la Tabla 2.

La transfección y activación del H<sub>3</sub>R nativo con el A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qi4}$  produjo movilización de Ca<sup>2+</sup>, sugiriendo proximidad física entre los receptores y por lo tanto heterodimerización. Congruente con el acople del H<sub>3</sub>R a proteínas G $\alpha_{i/o}$ , no se observó respuesta cuando se co-expresó y se co-activó al H<sub>3</sub>R con el A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qs4}$  (Figura 10A). En acuerdo con los resultados previos, no se observó respuesta al activar al A<sub>2A</sub>R nativo co-expresado con el H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$  o el H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qs4}$  (Figura 10B). Sin embargo, cuando el A<sub>2A</sub>R nativo fue co-expresado con el H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$ , no se observó respuesta a la activación del segundo receptor, sugiriendo preferencia del H<sub>3</sub>R para formar heterodímeros y no homodímeros (Figura 10C).

**A****B****C****D****E****F**

**Figura 10. Los receptores A<sub>2A</sub> y H<sub>3</sub> experimentan complementación funcional en células HEK-293T.** **A.** La activación del H<sub>3</sub>R nativo con el agonista RAMH indujo movilización de Ca<sup>2+</sup> al ser co-transfectado con el A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qi4}$ , pero no con el A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qs4}$ . **B.** No se observó movilización de Ca<sup>2+</sup> cuando el A<sub>2A</sub>R nativo se co-transfectó con las construcciones H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qs4}$  o H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$ , confirmando la incapacidad del A<sub>2A</sub>R para activar proteínas G quiméricas. **C.** La movilización de Ca<sup>2+</sup> inducida por la activación del H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$  (Figura 2E) fue prevenida cuando dicha construcción se co-expresó con el A<sub>2A</sub>R nativo, sugiriendo preferencia del H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$  para formar heterodímeros. **D.** Ensayo de complementación funcional que muestra que la co-activación del H<sub>3</sub>R nativo con concentraciones crecientes de RAMH, y del A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qi4}$  con una concentración única de CGS-21680 no modificó la respuesta observada previamente (comparar con la Figura 3A). **E.** La co-activación del H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$  y del A<sub>2A</sub>R nativo no recuperó la respuesta de Ca<sup>2+</sup> observada cuando el H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$  se transfectó solo. **F.** El heterodímero del A<sub>2A</sub>R con el receptor a dopamina D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>R) fue utilizado como control positivo para estos experimentos. La activación del D<sub>2</sub>R con concentraciones crecientes del agonista quinpirole indujo movilización de Ca<sup>2+</sup> sólo cuando el receptor se co-expresó con la construcción quimérica A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qi4}$ . En todas las gráficas los valores son promedios  $\pm$  ESM de 3 replicados en un experimento representativo. El análisis cuantitativo se presenta en la Tabla 2.

Para estudiar con mayor detalle la posible pérdida de señalización del H<sub>3</sub>R al co-expresarse con el A<sub>2A</sub>R, se co-transfectaron los receptores A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qi4}$  y H<sub>3</sub>R, y se co-activaron usando una concentración fija de CGS-21680 (1  $\mu$ M), agonista del A<sub>2A</sub>R, y concentraciones crecientes de RAMH, agonista del H<sub>3</sub>R, sin advertir cambios significativos en la respuesta (Figura 10D; Tabla 2). De manera similar, al co-activar a los receptores H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$  y A<sub>2A</sub>R, utilizando una concentración de 1  $\mu$ M de RAMH, tampoco se observaron cambios en la movilización de Ca<sup>2+</sup> (Figura 10E, Tabla 2).

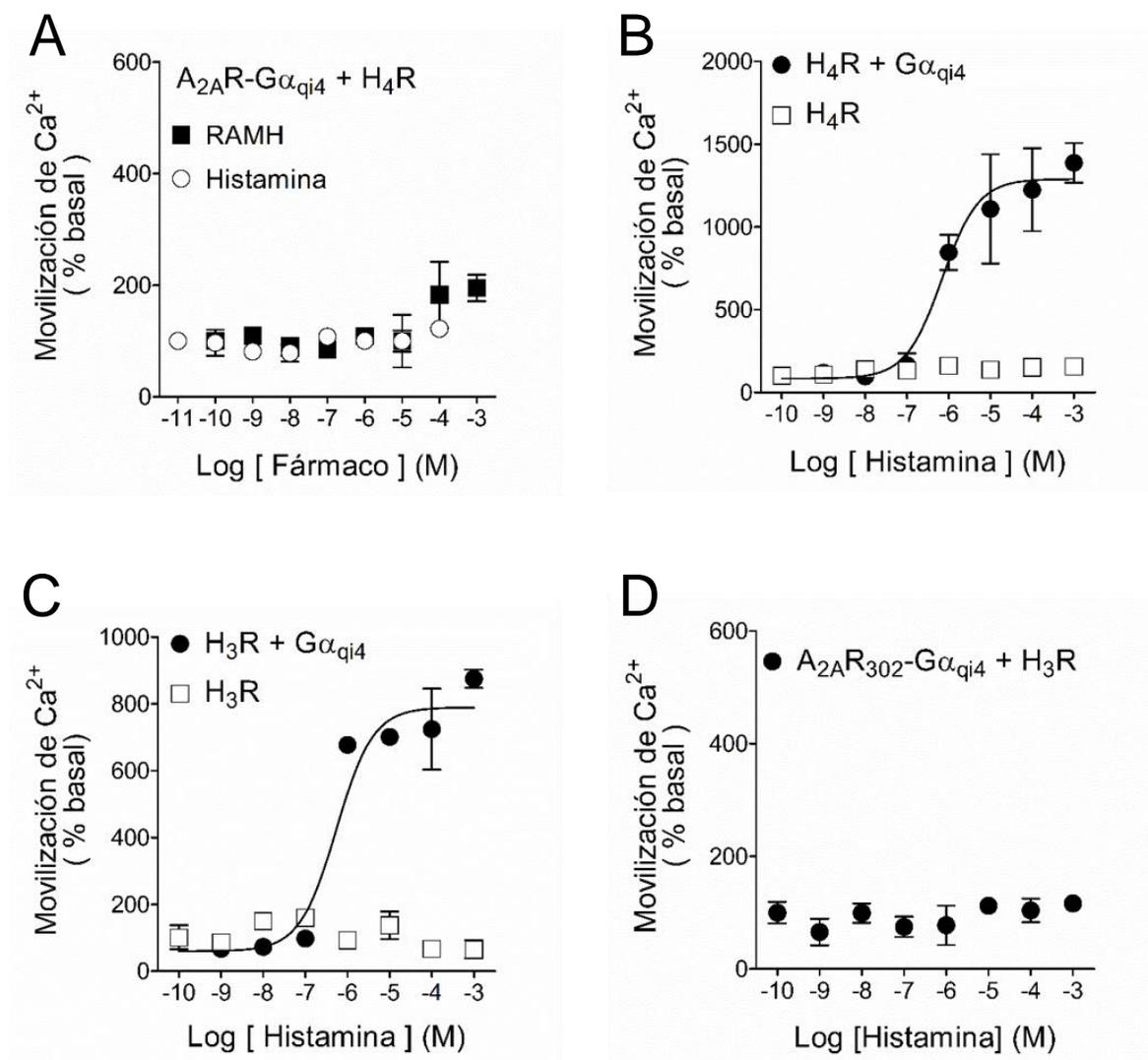
El A<sub>2A</sub>R puede formar heterodímeros con el D<sub>2</sub>R (Ferré y cols., 1997), y esta interacción fue por lo tanto utilizada como control positivo. En células co-transfectadas con el D<sub>2</sub>R y el A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qi4}$ , la activación del D<sub>2</sub>R con quinpirole indujo movilización de Ca<sup>2+</sup>, la cual no fue observada cuando se activó al D<sub>2</sub>R transfectado aisladamente (Figura 10F). Estos datos confirman que la movilización de Ca<sup>2+</sup> inducida por el complejo H<sub>3</sub>R/A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qi4}$  se debe a complementación funcional y por lo tanto heterodimerización, descartando que pueda ser resultado de colisiones aleatorias.

Para demostrar la selectividad de la interacción H<sub>3</sub>R/A<sub>2A</sub>R, usamos como control negativo al receptor a histamina H<sub>4</sub> (H<sub>4</sub>R), el cual tiene similitud en los segmentos transmembranales de 65% con el H<sub>3</sub>R y comparte su vía de señalización. Al co-expresar al H<sub>4</sub>R con el A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qi4}$ , la activación del primero con histamina o RAMH no generó movilización de Ca<sup>2+</sup>, apoyando la especificidad de la interacción H<sub>3</sub>R/A<sub>2A</sub>R y sugiriendo que el H<sub>4</sub>R no puede formar heterodímeros con el A<sub>2A</sub>R (Figura 11A). Para descartar que este resultado fuese resultado de una deficiente funcionalidad del H<sub>4</sub>R, se evaluó la co-transfección de este último con la proteína G $\alpha_{qi4}$ . En esta condición, la activación del H<sub>4</sub>R con histamina o RAMH indujo movilización de Ca<sup>2+</sup>, corroborando la funcionalidad del H<sub>4</sub>R y sustentando su utilidad como control negativo (Figura 11B, Tabla 2). De manera interesante, aunque la activación del H<sub>3</sub>R con histamina indujo movilización de Ca<sup>2+</sup> cuando el receptor se co-expresó con la proteína G $\alpha_{qi4}$  (Figura 11C), la activación con histamina del H<sub>3</sub>R co-expresado con A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-G $\alpha_{qi4}$  no produjo respuesta (Figura 11D). Este resultado sugiere que la interacción A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R depende del agonista del H<sub>3</sub>R utilizado.

## 6.2 La co-activación del dímero A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R aumenta la señalización del A<sub>2A</sub>R

Los resultados antes descritos sugieren fuertemente que los receptores A<sub>2A</sub> y H<sub>3</sub> pueden formar un heterodímero en las células HEK-293T. Sin embargo, cambios en la señalización individual de los receptores después de la formación del heterodímero no fueron evidentes en el ensayo de complementación funcional. Para estudiar estos cambios, usamos ensayos de formación de AMPc en células HEK293T transfectadas con los receptores 3xHA-A<sub>2A</sub>R y 3xHA-H<sub>3</sub>R. La activación del receptor 3xHA-A<sub>2A</sub>R transfectado individualmente indujo un aumento en la formación de AMPc concordante con su acople a proteínas G $\alpha_s$  (Figura 12A; Tabla 3). Cuando se co-transfectó al 3xHA-H<sub>3</sub>R con el 3xHA-A<sub>2A</sub>R y se co-activaron los receptores usando 100 nM de RAMH (3xHA-H<sub>3</sub>R) y concentraciones crecientes de CGS-26180 (3xHA-A<sub>2A</sub>R), la eficacia del 3xHA-A<sub>2A</sub>R aumentó de 153 ± 7% a 248 ± 9% de la formación basal de AMPc ( $P < 0.01$ ), mientras no se observó un cambio

significativo en el valor de la  $pEC_{50}$ , indicativa de la potencia del agonista (Figura 12B y Tabla 3).



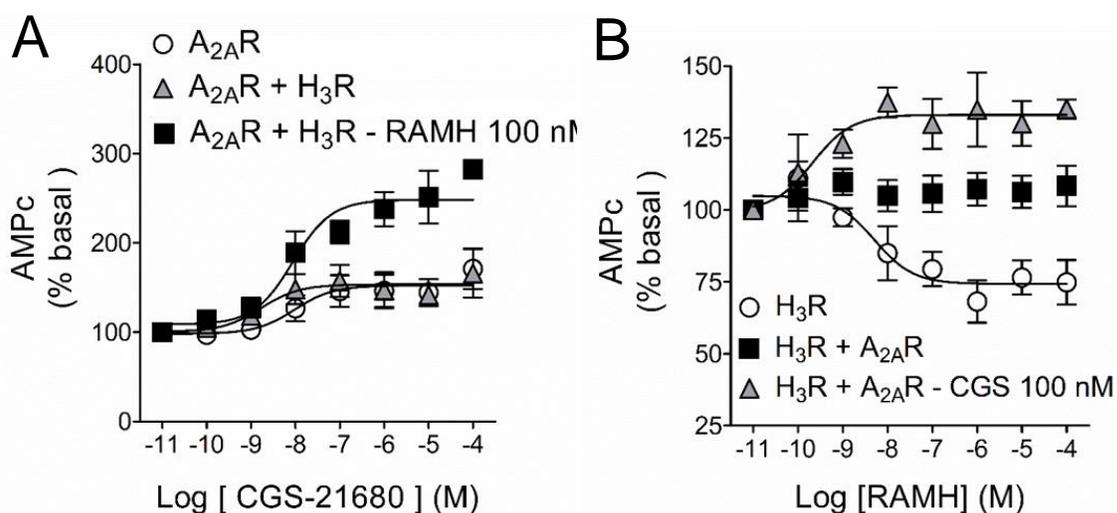
**Figura 11. Dependencia del ligando de la formación del heterodímero  $A_{2A}R-H_3R$  analizado por ensayos de complementación funcional.** **A.** El receptor a histamina  $H_4$  ( $H_4R$ ) fue utilizado como control negativo. No se observó complementación funcional entre el  $A_{2A}R_{302}-G\alpha_{q14}$  y el  $H_4R$  en presencia de histamina o RAMH, mostrando la especificidad de la interacción  $A_{2A}R-H_3R$ . **B.** La activación del  $H_4R$  con histamina indujo movilización de  $Ca^{2+}$  sólo cuando fue co-expresado con la proteína quimérica  $G\alpha_{q14}$ , mostrando que el resultado previo no se debe a incapacidad del  $H_4R$  para activar a dicha proteína. **C.** De manera similar a lo observado con el  $H_4R$ , la activación del  $H_3R$  con histamina indujo movilización de  $Ca^{2+}$  cuando se co-expresó con la proteína  $G\alpha_{q14}$ . **D.** La activación del  $H_3R$  con histamina no mostró complementación funcional cuando se co-expresó con el  $A_{2A}R_{302}-G\alpha_{q14}$ . En todas las gráficas los valores son los promedios  $\pm$  ESM de 3 replicados en un experimento representativo. El análisis cuantitativo se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Características farmacológicas de los ensayos de complementación funcional entre los receptores A<sub>2A</sub>R-H<sub>3</sub>R en células HEK-293T.

Transfección	Agonista	E <sub>max</sub> (%)	pEC <sub>50</sub>
H <sub>3</sub> R + G $\alpha$ <sub>qi4</sub>	RAMH	419 ± 25	7.73 ± 0.31
	Histamina	504 ± 22 <sup>b</sup>	6.19 ± 0.17 <sup>b</sup>
H <sub>3</sub> R <sub>427</sub> -G $\alpha$ <sub>qi4</sub>	RAMH	753 ± 41	7.14 ± 0.21
H <sub>3</sub> R <sub>427</sub> -G $\alpha$ <sub>qi4</sub> + H <sub>3</sub> R	RAMH	523 ± 41 <sup>b</sup>	7.38 ± 0.34
A <sub>2A</sub> R <sub>302</sub> -G $\alpha$ <sub>qi4</sub> + H <sub>3</sub> R	RAMH	449 ± 25	7.31 ± 0.23
	RAMH + CGS	429 ± 14 <sup>ns</sup>	7.63 ± 0.15
H <sub>4</sub> R + G $\alpha$ <sub>qi4</sub>	Histamina	725 ± 51	6.35 ± 0.25
	RAMH	551 ± 27 <sup>a</sup>	6.15 ± 0.16
H <sub>2</sub> R + G $\alpha$ <sub>qs4</sub>	Dimaprit	860 ± 37	6.15 ± 0.12
A <sub>2A</sub> R <sub>302</sub> -G $\alpha$ <sub>qi4</sub> + D <sub>2</sub> R	Quinpirole	612 ± 34	6.47 ± 0.22

Los valores son el promedio ± ESM de 3 experimentos. La comparación estadística se realizó entre los dos agonistas para la misma transfección, o entre la transfección sola del receptor quimérico con la transfección del receptor quimérico y el receptor nativo. ns, sin diferencia significativa, <sup>a</sup>*P* < 0.05; <sup>b</sup>*P* < 0.01, prueba *t* de Student. La concentración de los agonistas RAMH (H<sub>3</sub>R) y CGS-21680 (A<sub>2A</sub>R) fue 100 nM. RAMH, R- $\alpha$ -metil-histamina; CGS, CGS-21680.

El H<sub>3</sub>R se acopla a proteínas G $\alpha_{i/o}$  y por lo tanto inhibe la formación de AMPc. Para estudiar la funcionalidad de este receptor y los cambios en su señalización inducidos por la heterodimerización con el A<sub>2A</sub>R, se transfectaron células HEK-293T con el 3xHA-H<sub>3</sub>R y la formación de AMPc se estimuló con forskolina (30  $\mu$ M). La activación del H<sub>3</sub>R con concentraciones crecientes del agonista RAMH inhibió la formación de AMPc inducida por forskolina con un efecto máximo (I<sub>max</sub>) de  $-26 \pm 2\%$  y una pI<sub>C50</sub> de  $8.1 \pm 0.3$ . La co-transfección y co-activación del A<sub>2A</sub>R con el agonista CGS-21680 previno la señalización del H<sub>3</sub>R (Figura 12B). Estos resultados sugieren que en el heterodímero A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R, la señalización del A<sub>2A</sub>R aumenta, pero que el H<sub>3</sub>R pierde la capacidad para activar proteínas G.



**Figura 12.** Efecto de la co-expresión y co-activación de los receptores A<sub>2A</sub>R y H<sub>3</sub>R en la formación de AMPc. **A.** La formación de AMPc inducida por la activación del A<sub>2A</sub>R con el agonista CGS-21680 aumentó cuando se co-expresó y co-activó al H<sub>3</sub>R. No se observaron cambios en la potencia o eficacia del CGS-21680. **B.** La co-expresión y co-activación del A<sub>2A</sub>R previno la inhibición de la formación de AMPc inducida por la activación del H<sub>3</sub>R, sugiriendo la prevalencia del A<sub>2A</sub>R en la señalización después de la formación del heterodímero. Los valores son promedios  $\pm$  ESM de 5 replicados en experimentos representativos. Los valores de pI<sub>C50</sub> y efecto máximo (E<sub>max</sub>) o efecto mínimo (I<sub>max</sub>) se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Características farmacológicas de los ensayos de formación de AMPc en células HEK-293T.

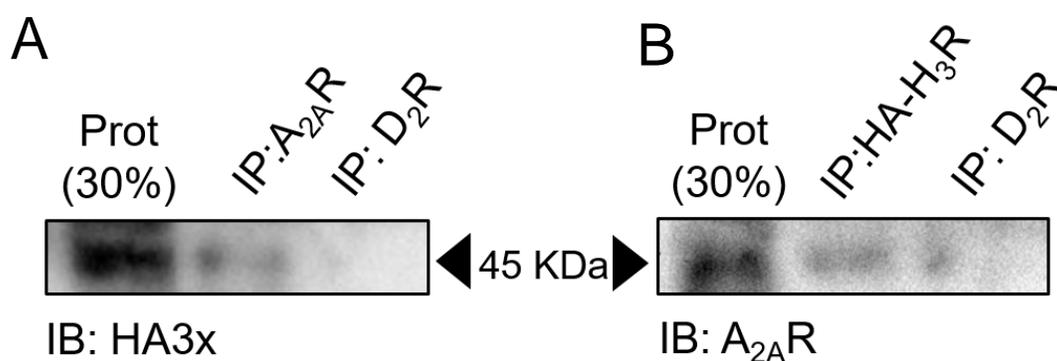
Transfección	Agonista	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	pIC <sub>50</sub>	I <sub>max</sub> (%)
A <sub>2A</sub> R	CGS	8.0 ± 0.4	152 ± 7	-	-
A <sub>2A</sub> R + H <sub>3</sub> R	CGS	8.7 ± 0.5	153 ± 7	-	-
A <sub>2A</sub> R + H <sub>3</sub> R	CGS+RAMH	8.0 ± 0.2	248 ± 9 <sup>b</sup>	-	-
H <sub>3</sub> R	RAMH	-	-	8.1 ± 0.3	-26 ± 2
H <sub>3</sub> R + A <sub>2A</sub> R	RAMH	10.6 ± 1	114 ± 3	-	-
H <sub>3</sub> R + A <sub>2A</sub> R	RAMH+CGS	9.9 ± 0.6	120 ± 2	-	-

Los datos son los promedios ± ESM de 3-5 experimentos. La comparación se realizó entre la transfección aislada de un receptor con la co-transfección de los receptores. <sup>a</sup>P < 0.05; <sup>b</sup>P < 0.01; prueba *t* de Student. La concentración de RAMH y CGS-21680 fue 100 nM. RAMH, R- $\alpha$ -metil-histamina; CGS, CGS-21680.

### 6.3 Co-inmunoprecipitación de los receptores A<sub>2A</sub> y 3xHA-H<sub>3</sub>

Para confirmar la interacción física entre estos receptores, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) en extractos de proteína obtenidos de células HEK-293T transfectadas con el A<sub>2A</sub>R nativo y el 3xHA-H<sub>3</sub>R (marcado con la bandera de hemaglutinina). Se usó al HA3x-H<sub>3</sub>R para evitar la inespecificidad del anticuerpo que detecta al H<sub>3</sub>R, utilizando alternativamente un anticuerpo específico contra la bandera 3xHA. Cuando se inmunoprecipitó al 3xHA-H<sub>3</sub>R y se detectó al A<sub>2A</sub>R, se observó una banda de ~45 KDa solamente en el extracto proteico y en la inmunoprecipitación del 3xHA-H<sub>3</sub>R. La banda no fue detectada cuando se co-inmunoprecipitó al D<sub>2</sub>R el cual fue utilizado como control negativo. La migración relativa de las bandas corresponde a la esperada para el A<sub>2A</sub>R (Figura 13A)

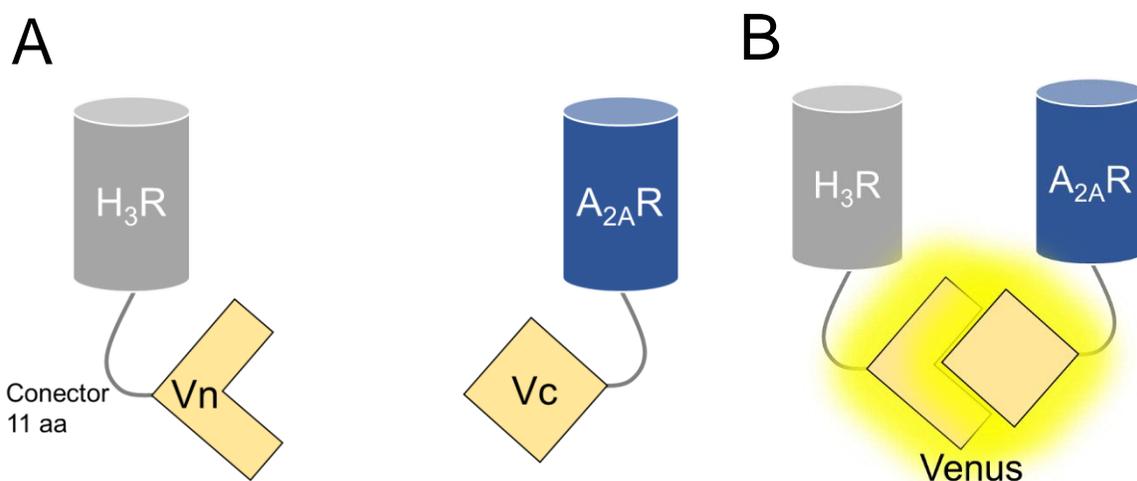
De manera similar, cuando se co-inmunoprecipitó al A<sub>2A</sub>R de los mismos extractos proteicos, se detectó una banda de ~45 KDa correspondiente a la migración esperada para el 3xHA-H<sub>3</sub>R en la proteína total y en la co-inmunoprecipitación, misma que no fue detectada cuando se co-inmunoprecipitó al D<sub>2</sub>R (Figura 13B). Estos resultados complementan la evidencia mostrada previamente indicando que después de su expresión en las células HEK-293T los receptores A<sub>2A</sub> y H<sub>3</sub> se encuentran en proximidad física suficiente para formar un heterodímero.



**Figura 13. Co-inmunoprecipitación del A<sub>2A</sub>R y el H<sub>3</sub>R en extractos proteicos de células HEK-293T.** **A.** Co-inmunoprecipitación del H<sub>3</sub>R marcado con una triple bandera de hemaglutinina (3xHA-H<sub>3</sub>R) con el A<sub>2A</sub>R. Se observa una banda de ~45 kDa correspondiente a la migración esperada para el H<sub>3</sub>R. **B.** Un resultado similar se observó cuando el 3xHA-H<sub>3</sub>R fue inmunoprecipitado y la inmunodetección se dirigió al A<sub>2A</sub>R. En ambos experimentos 30% de la proteína total fue utilizada como control (Prot). Como control negativo se usó un anticuerpo contra el receptor a dopamina D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>R). Las imágenes son de un experimento representativo de 3 realizados con resultados similares.

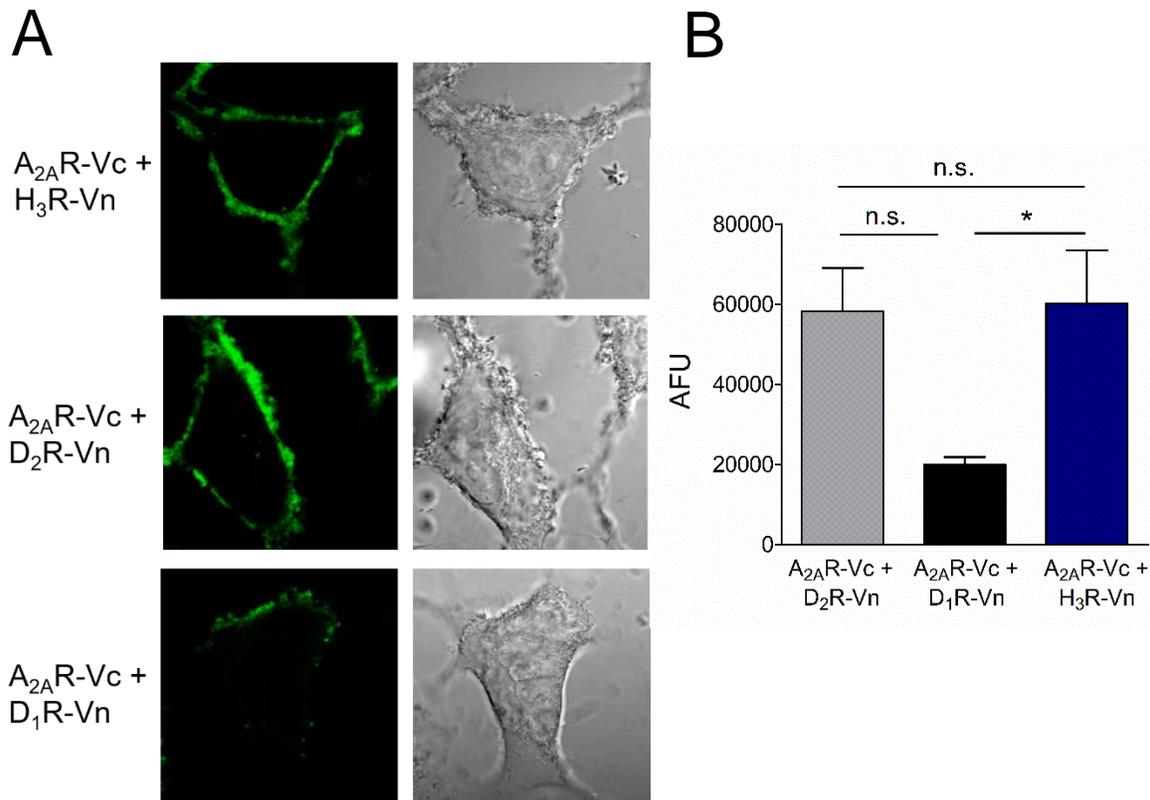
#### 6.4 Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC)

Para confirmar la existencia y especificidad de la interacción  $A_{2A}R$ - $H_3R$  se usó la técnica de BiFC (Complementación Bimolecular Fluorescente). Esta técnica se basa en la complementación de las mitades amino y carboxilo no fluorescentes de la proteína Venus. Cuando estas mitades se encuentran próximas (distancia  $\leq 10 \text{ \AA}$ ), se unen y regeneran a la proteína Venus que emite fluorescencia (Figura 14). Las mitades amino o carboxilo de la proteína Venus ( $V_n$  y  $V_c$ , respectivamente) se fusionaron por medio de un conector peptídico a los receptores  $A_{2A}$  y  $H_3$  nativos como se explica en la sección de Métodos, y los receptores se expresaron conjuntamente en células HEK-293T. Como control positivo se usó al  $D_2R$  unido a  $V_n$ , y como control negativo al  $D_1R$  unido también a  $V_n$ .



**Figura 14. Principio funcional de los experimentos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC).** **A.** Los receptores  $H_3$  y  $A_{2A}$  fueron unidos por un conector a las mitades amino ( $V_n$ ) y carboxilo ( $V_c$ ) de la proteína Venus, respectivamente. **B.** Cuando estos receptores se encuentran en cercanía suficiente para formar un heterodímero, la proteína Venus se re-constituye y emite fluorescencia, indicativa de la heterodimerización.

Cuando se expresó al A<sub>2A</sub>R-Vc con el H<sub>3</sub>R-Vc en células HEK-293T se observó complementación de la proteína Venus (Vc + Vn), localizada en la membrana celular (Figura 15A, panel superior). El nivel de fluorescencia fue similar al observado con la formación del heterodímero A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R, empleado como control positivo (Figura 15A, panel intermedio), y fue mayor al control negativo A<sub>2A</sub>R-D<sub>1</sub>R (Figura 15A, panel inferior), mostrando la especificidad de la interacción A<sub>2A</sub>R-H<sub>3</sub>R (Figura 15B).

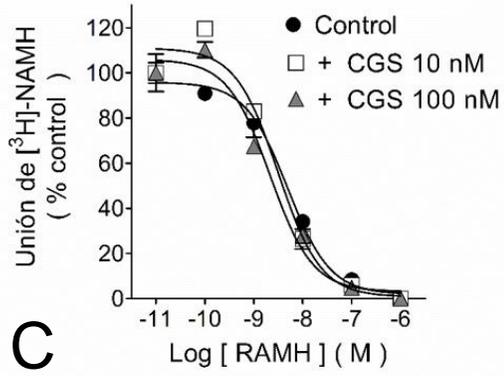
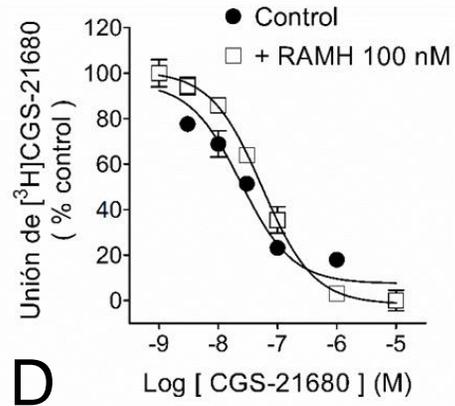
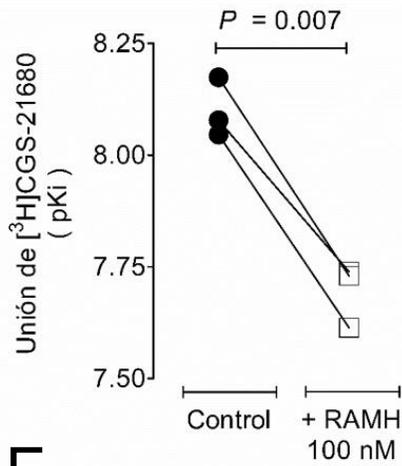
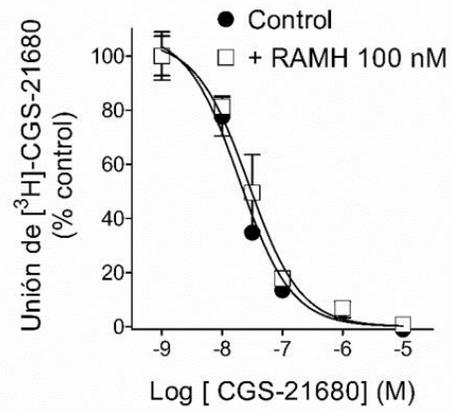
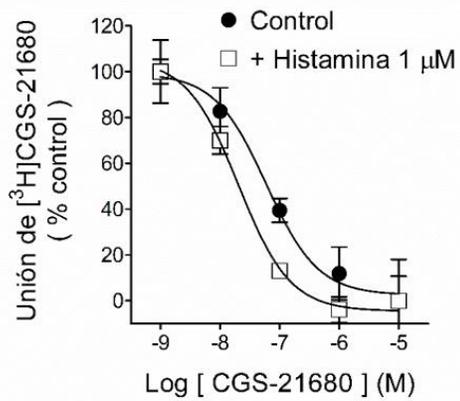
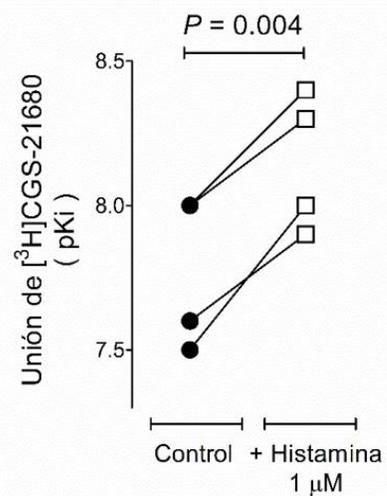


**Figura 15. Complementación bimolecular fluorescente entre los receptores A<sub>2A</sub>R y H<sub>3</sub>R.** **A.** Microfotografía confocal de células HEK-293T representativa que muestra la fluorescencia resultante (verde) de la complementación de la proteína Venus del heterodímero A<sub>2A</sub>R-H<sub>3</sub>R (panel superior). El heterodímero A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R (panel intermedio) se utilizó como control positivo. El D<sub>1</sub>R no dimeriza con el A<sub>2A</sub>R y se utilizó por lo tanto como control negativo. **B.** Análisis cuantitativo de los experimento de BiFC. La fluorescencia se determinó como unidades arbitrarias (AUF) y los valores son el promedio ± ESM de 10 células por transfección. El análisis estadístico se realizó con Anova de una vía y la prueba de Dunnett. \**P*<0.05, n.s., no significativo.

## 6.5 La activación del H<sub>3</sub>R disminuye la afinidad del A<sub>2A</sub>R por un agonista selectivo en membranas de sinaptosomas estriatales

Cómo se mencionó en la Introducción, en el neostriado los receptores A<sub>2A</sub> y H<sub>3</sub> se co-expresan en las proyecciones cortico-estriatales que inervan a las NEMs de la vía directa, así como en los cuerpos celulares y las terminales sinápticas de las NEMs de la vía indirecta. Para explorar la existencia *in vivo* de un heterodímero de estos dos receptores, se utilizaron membranas de sinaptosomas estriatales en las que se evaluó la unión de radioligandos selectivos para el H<sub>3</sub>R ([<sup>3</sup>H]-RAMH) o el A<sub>2A</sub>R ([<sup>3</sup>H]-CGS-21680) y su desplazamiento por agonistas selectivos.

Como primer abordaje, se analizaron posibles cambios en la afinidad del H<sub>3</sub>R por el agonista RAMH inducidos por co-activación del A<sub>2A</sub>R. Dos concentraciones del CGS-21680, agonista del A<sub>2A</sub>R (10 y 100 nM), no modificaron la afinidad del H<sub>3</sub>R por RAMH (Figura 16A y Tabla 4). Sin embargo, la activación del H<sub>3</sub>R por RAMH (100 nM) disminuyó la afinidad del A<sub>2A</sub>R por CGS-21680 (pEC<sub>50</sub> 8.10 ± 0.04 y 7.70 ± 0.04, respectivamente,  $P < 0.001$ , prueba *t* de Student pareada), sugiriendo una interacción directa entre los receptores (Figura 16B y 16C). De manera interesante, el cambio en la afinidad del A<sub>2A</sub>R por CGS-21680 no fue observado cuando se emplearon membranas totales del neostriado (Figura 16D). Estos resultados no sólo apoyan la existencia de un heterodímero A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R *in vivo* sino que también sugieren que el heterodímero está presente en las terminales nerviosas estriatales y no en el cuerpo celular de las NEMs.

**A****B****C****D****E****F**

**Figura 16. La activación del H<sub>3</sub>R disminuye la afinidad del A<sub>2A</sub>R por el agonista CGS-21680 en membranas sinaptosomales, pero no en membranas totales del neocórtex de la rata.** **A.** Dos concentraciones de CGS-21680 (10 y 100 nM) no modificaron la afinidad del H<sub>3</sub>R por el agonista RAMH en membranas de sinaptosomas estriatales. **B.** En la misma preparación, la activación por RAMH (100 nM) del H<sub>3</sub>R disminuyó la afinidad del A<sub>2A</sub>R por el agonista CGS-21680. Los valores son promedios ± ESM de 3 replicados en un experimento representativo. **C.** Análisis de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado con prueba *t* de Student pareada. **D.** La activación del H<sub>3</sub>R por RAMH no disminuyó la afinidad del A<sub>2A</sub>R por CGS-21680 en membranas totales del neocórtex. **E.** La histamina (1 μM), ligando endógeno del H<sub>3</sub>R, aumentó la afinidad del A<sub>2A</sub>R por su agonista CGS-21680. Análisis de 4 experimentos independientes (prueba *t* de Student pareada). Los valores del -Log<sub>10</sub> de la constante de inhibición (K<sub>i</sub>) se muestran en la Tabla 4.

Los ensayos de complementación funcional sugirieron que la activación del H<sub>3</sub>R con RAMH promueve la formación del heterodímero A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R, mientras que la activación con histamina parece modular la interacción de forma distinta. Para explorar si el posible agonismo sesgado era observado también en tejido del neocórtex, se realizaron ensayos de inhibición homóloga de la unión de [<sup>3</sup>H]-CGS-21680, activando al receptor H<sub>3</sub>R con el agonista endógeno histamina (1 μM). Bajo estas condiciones la afinidad del A<sub>2A</sub>R aumentó de manera significativa y consistente (pK<sub>i</sub>, control 7.77 ± 0.13; + histamina: 8.15 ± 0.11, *P* = 0.004, prueba *t* de Student pareada), efecto opuesto al observado con la RAMH (Figura 16E y 16F). Este resultado sugiere que la RAMH y la histamina estabilizan al H<sub>3</sub>R en estados conformacionales distintos, lo cual repercute directamente la interface de interacción con el A<sub>2A</sub>R.

**Tabla 4.** Efecto de la activación de los receptores A<sub>2A</sub> o H<sub>3R</sub> en la afinidad del segundo receptor por un agonista selectivo en membranas estriatales.

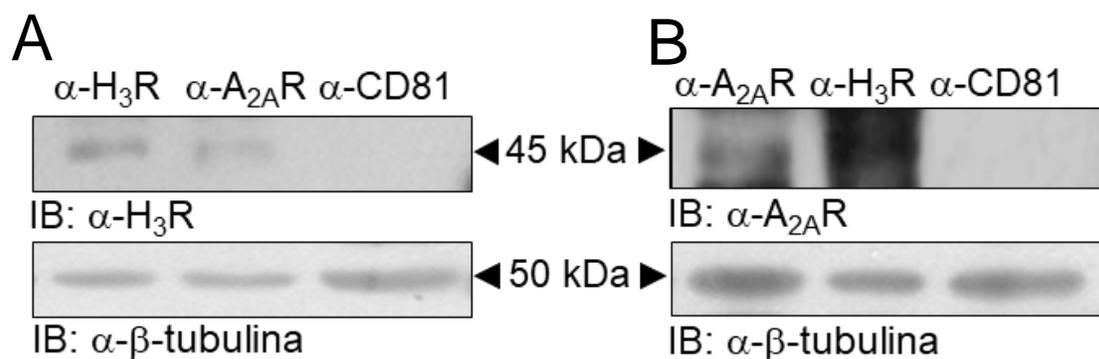
	pKi	Bmax (%)
<b>[<sup>3</sup>H]-NAMH</b>		
Sinaptosomas		
RAMH	9.09 ± 0.22	100.0 ± 0.3
RAMH + CGS 10 nM	8.99 ± 0.02 <sup>ns</sup>	110.0 ± 4.0 <sup>ns</sup>
RAMH + CGS 100 nM	9.08 ± 0.06 <sup>ns</sup>	103.0 ± 4.1 <sup>ns</sup>
<b>[<sup>3</sup>H]CGS-21680</b>		
Estriado total		
CGS	8.06 ± 0.15	100.0 ± 14
CGS + RAMH	8.11 ± 0.04 <sup>ns</sup>	88.0 ± 6.0 <sup>ns</sup>
Sinaptosomas		
CGS	8.10 ± 0.04	100.0 ± 9.0
CGS + RAMH	7.70 ± 0.04 <sup>a</sup>	88.1 ± 10.0 <sup>ns</sup>

Los datos se expresan como pKi (-Log<sub>10</sub> de la constante de inhibición, Ki) y son los promedios ± ESM de 3-5 experimentos. Para la unión de [<sup>3</sup>H]-NAMH el análisis estadístico se realizó con Anova de una vía y la prueba de Dunnett. Para la unión de [<sup>3</sup>H]-CGS-21680, los valores en presencia de RAMH se compararon con el control correspondiente con la prueba *t* de Student. <sup>a</sup>*P* < 0.001, ns, sin diferencia significativa. CGS, CGS-21680. La RAMH (R- $\alpha$ -metil-histamina) se empleó en una concentración de 100 nM en todos los experimentos.

#### 6.6 Co-inmunoprecipitación del H<sub>3R</sub> y el A<sub>2A</sub>R en extractos proteicos de sinaptosomas del neostriado de la rata

Los ensayos de unión de radioligando sugerían de manera consistente una interacción a nivel de la membrana celular entre el A<sub>2A</sub>R y el H<sub>3R</sub>; sin embargo, no

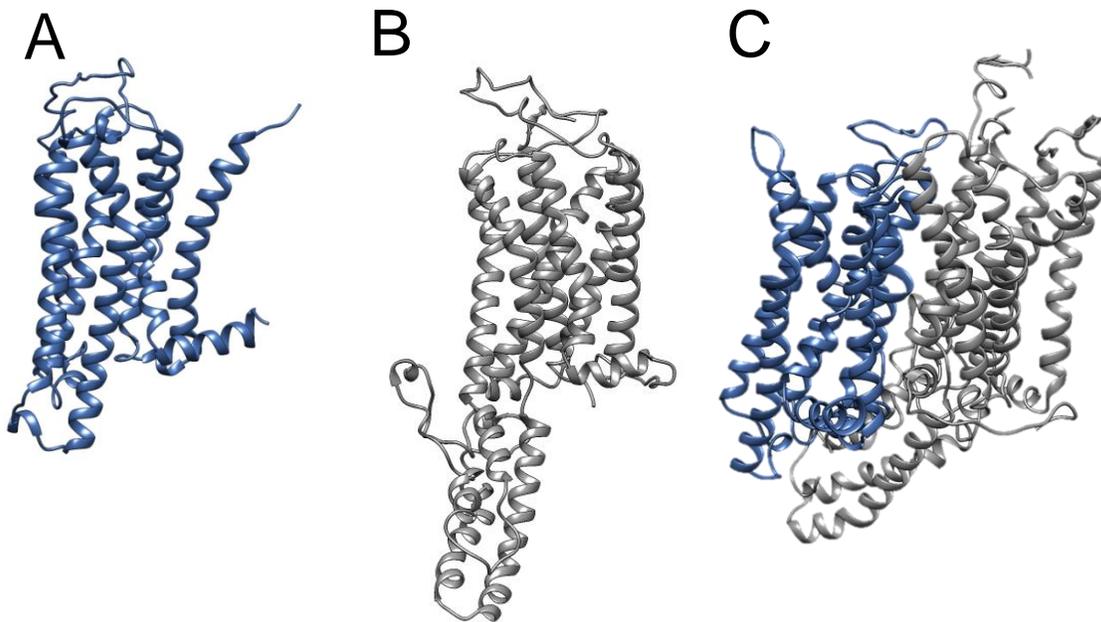
demuestran que la interacción ocurra realmente. Para evaluar con más detalle la existencia del heterodímero *in vivo*, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en extractos proteicos de sinaptosomas estriatales. En esta preparación, el H<sub>3</sub>R co-inmunoprecipitó con el A<sub>2A</sub>R, observado como una banda de ~45 kDa. Esta banda no se observó en el control negativo, o cuando las perlas fueron usadas individualmente (Figura 17). Estos resultados apoyan la existencia de la interacción en las terminales nerviosas del neostriado de la rata.



**Figura 17. Co-inmunoprecipitación de los receptores A<sub>2A</sub> y H<sub>3</sub> en extractos proteicos sinaptosomas estriatales.** **A.** El H<sub>3</sub>R co-inmunoprecipitó con el A<sub>2A</sub>R en los extractos proteicos de sinaptosomas estriatales. La banda de ~45 kDa corresponde a la migración esperada del H<sub>3</sub>R. No se observó la banda se observó en el control negativo (α-CD81). **B.** Co-inmunoprecipitación del A<sub>2A</sub>R con el H<sub>3</sub>R. Se observa una banda de ~45 kDa correspondiente a la migración esperada del A<sub>2A</sub>R. La figura muestra imágenes de un experimento representativo repetido 4 veces más con resultados similares. Un anticuerpo contra β-tubulina III fue utilizado como control de carga en ambos ensayos.

### 6.7 Estudio de la interface de interacción del heterodímero A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R

Un aspecto importante del descubrimiento de las interacciones proteína-proteína es su uso potencial como blancos terapéuticos. En esta área la cristalografía así como los modelos por homología generados a partir de los datos cristalográficos son herramientas muy valiosas para el diseño de fármacos y la evaluación *in silico* de los mismos. Por lo tanto, se decidió evaluar la interface de interacción entre el A<sub>2A</sub>R y el H<sub>3</sub>R. Para ello se generó un modelo por homología de ambos receptores (Figuras 18A y 18B) seguido de acople (*docking*) proteína-proteína (Figura 18C).

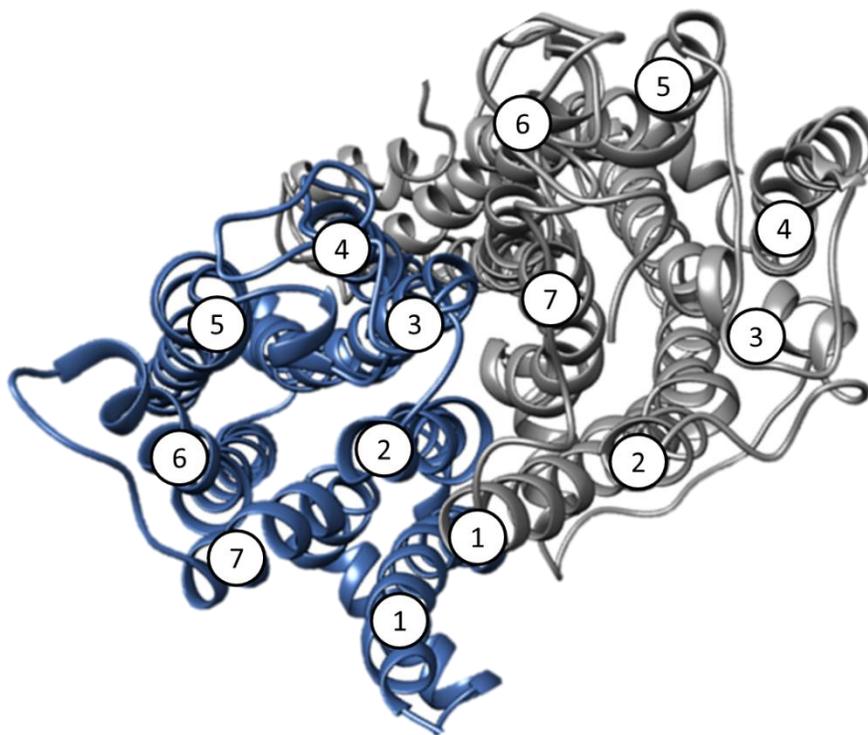


**Figura 18. Modelado por homología de los receptores a adenosina A<sub>2A</sub> y a histamina H<sub>3</sub>.** **A.** Modelo del receptor a adenosina A<sub>2A</sub>. El carboxilo terminal no fue considerado en el modelo por motivos de termodinámica. **B.** Modelo completo del receptor a histamina H<sub>3</sub>. **C.** Modelo de la interacción A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R obtenido por ensayos de acople molecular entre los modelos A y B.

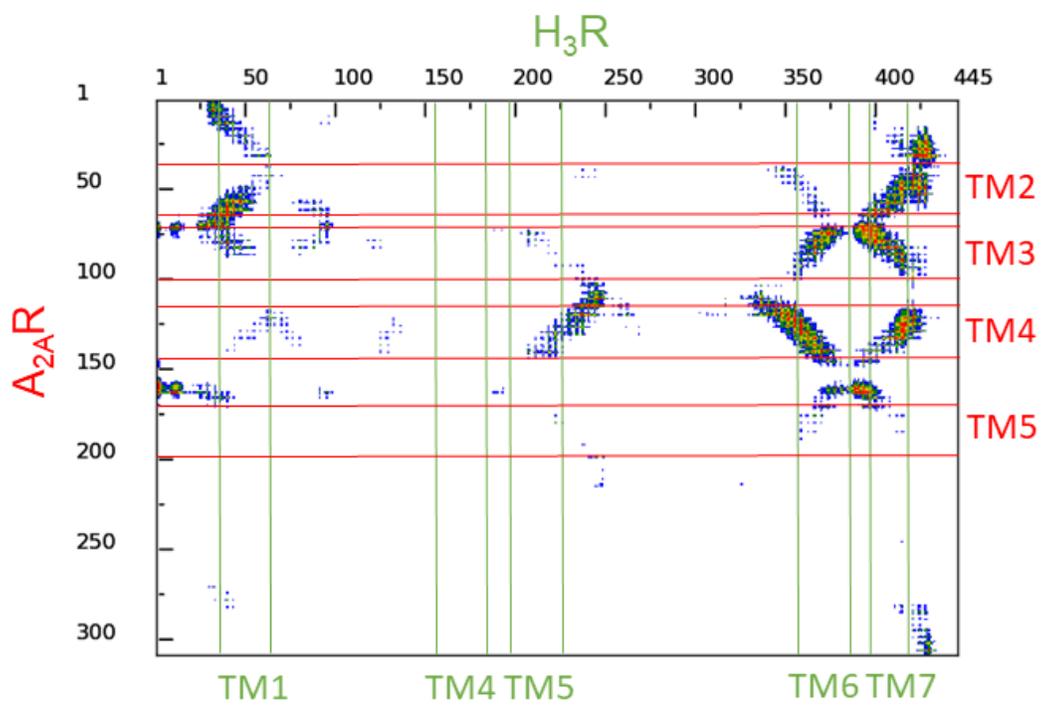
A partir de las simulaciones, se observó que los segmentos transmembranales TM2, TM3 y TM4, así como la segunda asa extracelular e intracelular del A<sub>2A</sub>R, forman la interface de interacción con los segmentos TM6 y TM7/hélice 8 y la tercera asa intracelular del H<sub>3</sub>R (Figura 19A).

En un primer análisis, utilizando un umbral de corte de 8 Amstrongs (Å) de distancia entre residuos intermoleculares, se identificaron 104 amino ácidos del A<sub>2A</sub>R y 109 del H<sub>3</sub>R que participan en la interface A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R, residiendo la mayoría de los contactos en los residuos 1-250 del A<sub>2A</sub>R, mientras que en el H<sub>3</sub>R los residuos de contacto se distribuyen en tres regiones: residuos 1-50, residuos 200-250, y residuos 325-425 (Figura 19B), con interacciones hidrofóbicas prevaleciendo en estas interacciones (Figura 20).

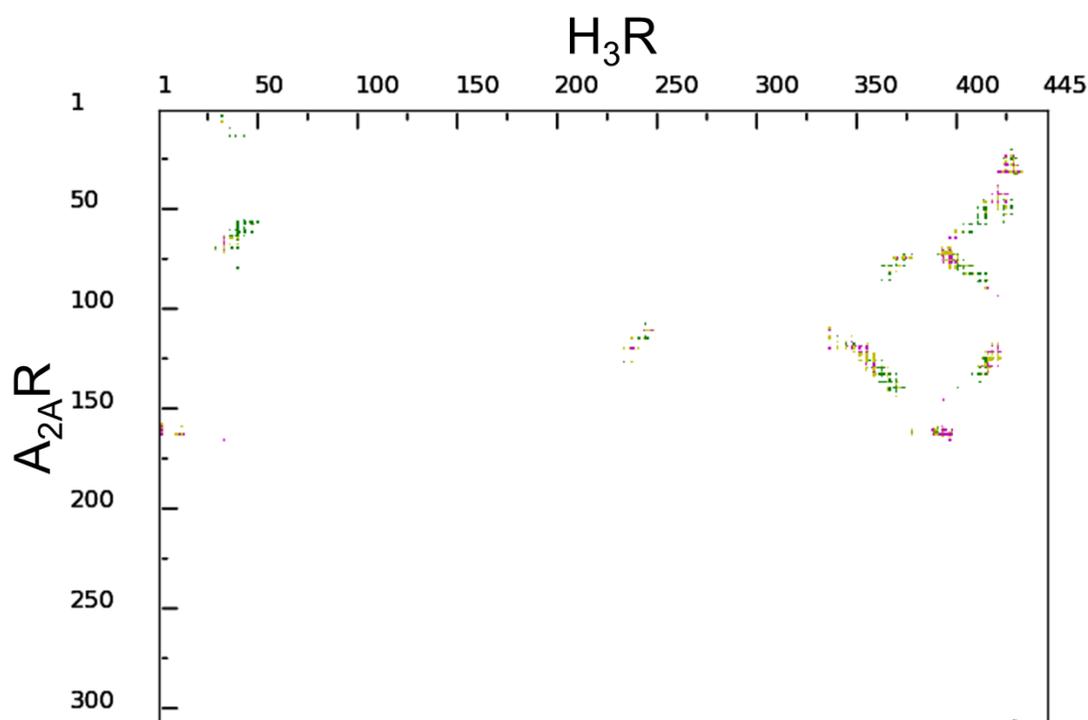
A



B

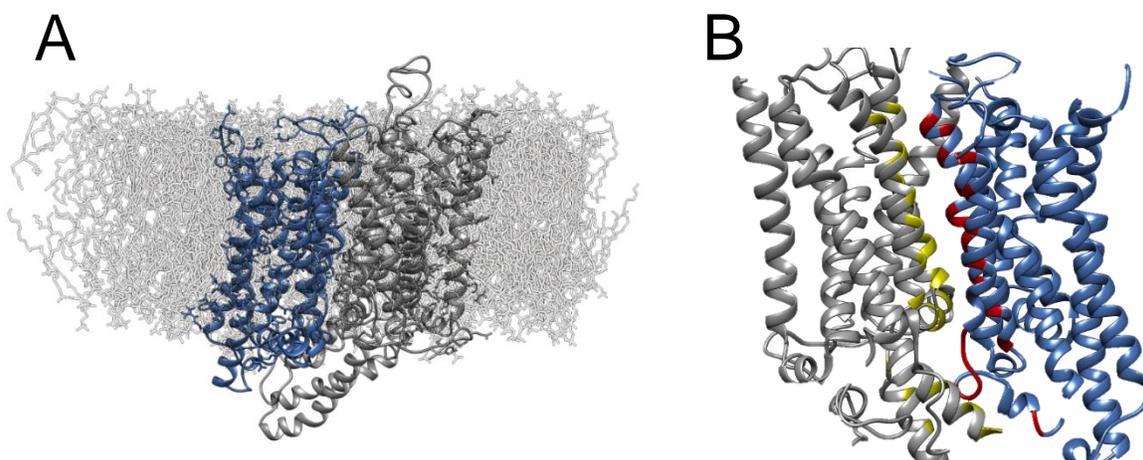


**Figura 19. Mapas de contacto entre el TM4 del A<sub>2A</sub>R y el TM7 del H<sub>3</sub>R.** **A.** Interface de interacción entre los receptores A<sub>2A</sub> (azul) y H<sub>3</sub> (gris). La superficie de contacto se establece entre las regiones transmembranales 1-4 del A<sub>2A</sub>R y 1, 6 y 7 del H<sub>3</sub>R. **B.** Residuos que conforman la interface A<sub>2A</sub>R-H<sub>3</sub>R con una distancia de 16 Å (azul), 13 Å (verde), 10 Å (amarillo) y 7 Å (naranja). La secuencia del A<sub>2A</sub>R se muestra en el eje Y. En líneas rojas se indican los residuos correspondientes a los segmentos transmembranales 2 a 5. En el eje de las X se muestra la secuencia de amino ácidos del H<sub>3</sub>R. En líneas verdes se delimitan las regiones transmembranales 1, 4, 5, 6 y 7. Se puede observar una zona de contacto entre los segmentos TM6 y 7 del H<sub>3</sub>R y TM2, 3 y 4 del A<sub>2A</sub>R.



**Figura 20. Mapa de interacciones químicas en la interface A<sub>2A</sub>R-H<sub>3</sub>R.** Las interacciones hidrofóbicas se indican en verde, las hidrofílicas en magenta y las hidrofóbicas-hidrofílicas en amarillo. Las interacciones hidrofóbicas prevalecen en los dominios que participan en la interacción.

Para mejorar la evaluación y generar un modelo que reproduzca el entorno fisiológico en que se encuentran los receptores, se realizó dinámica molecular del resultado de acople (*docking*). Para ello se embebió al complejo A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R en una membrana lipídica y se realizó la simulación por 1 μs (Figura 21A). El resultado de esta interacción se analizó manteniendo el punto de corte en 5 Å, encontrándose 22 residuos del A<sub>2A</sub>R y 25 residuos del H<sub>3</sub>R en proximidad suficiente para formar interacciones intermoleculares para conformar la interface de interacción A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R (Figura 21B y Tabla 5).



**Figura 21. Modelo de la interacción A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R en una bicapa lipídica.** **A.** Distribución membranal de los receptores A<sub>2A</sub> (azul) y H<sub>3</sub> (gris). Nótese la distribución intracelular de la tercera asa intracelular del H<sub>3</sub>R. **B.** Residuos de interacción entre el A<sub>2A</sub>R (rojo) y H<sub>3</sub>R (amarillo). Los residuos participantes en la interacción se identificaron estableciendo un espacio menor a 5 Å como distancia de interacción. Las interacciones se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 5.** Amino ácidos presentes en la interface de interacción entre los receptores A<sub>2A</sub> y H<sub>3</sub>.

A <sub>2A</sub> R	Posición A <sub>2A</sub> R		H <sub>3</sub> R	Posición H <sub>3</sub> R	
Leu	137	TM4	Leu	368	TM6
Phe	79	TM3	Ala	402	TM7
Ala	77	TM3	Thr	395	AE3
His	75	AE1	Leu	376	TM6
His	75	AE1	Leu	376	TM6
Phe	79	AE1	Leu	399	TM7
Phe	133	TM4	Leu	368	TM6
Phe	83	TM3	Ile	365	TM6
Leu	58	TM2	Leu	410	TM7
Leu	58	TM2	Val	409	TM7
Ala	54	TM2	Leu	413	TM7
Ala	50	TM2	Thr	423	CT
Lys	122	TM4	His	416	TM7
Tyr	43	TM2	Arg	420	CT
Val	57	TM2	Val	409	TM7
Ala	50	TM2	Leu	413	TM7
Met	140	TM4	Pro	372	TM6
Gly	123	TM4	Lys	357	AI3
Lys	122	TM4	Arg	353	AI3
Thr	119	TM4	Ser	350	AI3
Lys	122	TM4	Leu	232	AI3
Ala	121	TM4	Arg	236	AI3
Arg	120	TM4	Arg	236	AI3
Arg	120	TM4	Ala	239	AI3
Arg	120	TM4	Arg	346	AI3
Arg	111	AI2	Ala	239	AI3
Arg	111	AI2	Pro	241	AI3

Val	46	TM2	Arg	419	CT
Val	46	TM2	Thr	423	CT
Trp	129	TM4	Val	361	TM6
Trp	129	TM4	Cys	414	TM7
Ala	126	TM4	Lys	357	AI3

TM, segmento transmembranal; AI, asa intracelular, AE, asa extracelular, CT, carboxilo terminal.

## 7. Discusión

El receptor a histamina H<sub>3</sub> ha sido propuesto como un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de alteraciones neurológicas y psiquiátricas como la adicción, la depresión, la esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson (Nieto-Alamilla y cols., 2016). Sin embargo, su amplia expresión en el cerebro y los efectos que tiene en otros sistemas de neurotransmisores podrían resultar en efectos adversos cuando los fármacos selectivos del H<sub>3</sub>R se administran de manera sistémica. El A<sub>2A</sub>R también ha sido propuesto como una opción para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y posee una distribución estratégica en el neostriado para modular selectivamente las proyecciones glutamatérgicas originadas en la corteza cerebral y que inervan a las neuronas espinosas medianas estriatales de la vía directa (dNEMs) así como la excitabilidad de las neuronas espinosas medianas que originan la vía indirecta (iNEMs; Orru y cols., 2011). Los resultados de esta tesis permiten proponer una alternativa para dirigir fármacos específicamente a los H<sub>3</sub>Rs localizados en las iNEMs de la vía indirecta o en las aferentes corticales que establecen sinapsis con las dNEMs al dirigirlos al heterodímero A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R.

### 7.1 Interacción A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R

El hallazgo principal de este estudio fue la identificación, por primera vez, de un heterómero A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R, no solo en un sistema de expresión heteróloga sino también en un sistema nativo, las terminales nerviosas del neostriado de rata, conformadas primariamente por terminales sinápticas de las aferentes cortico-estriatales y de las colaterales de las NEMs.

La base del ensayo de complementación funcional requiere que un receptor carezca de funcionalidad y esta condición se obtuvo truncando el carboxilo terminal (CT). El corte del CT del H<sub>3</sub>R para generar receptores de 411 o 421 amino ácidos en vez de los 445 residuos del receptor original, fue suficiente para prevenir la activación por el H<sub>3</sub>R de la proteína quimérica G $\alpha_{qi4}$ . Sin embargo, la señalización del H<sub>3</sub>R<sub>411</sub> y H<sub>3</sub>R<sub>421</sub> no se pudo rescatar por co-transfección del receptor nativo, indicando que el CT remanente podría ser muy corto para establecer la interacción con el H<sub>3</sub>R nativo.

No obstante, la reducción de 445 a 427 amino ácidos permitió que el H<sub>3</sub>R<sub>427</sub> conservara su funcionalidad sin advertirse cambios significativos en la eficacia o en la potencia comparado con el H<sub>3</sub>R completo (Tabla 2).

Una posibilidad sería que un H<sub>3</sub>R trunco entre los amino ácidos 421 y 427 fuese lo suficientemente corto para abolir la señalización homo/monomérica, pero a la vez no lo suficientemente largo para complementar funcionalmente a un receptor nativo. El requerimiento de conservación de la hélice 8 ha sido demostrado para los receptores a dopamina D<sub>1</sub> y a opioides  $\kappa$  y  $\mu$  (van Rijn y cols., 2013). La tercera asa intracelular del H<sub>3</sub>R es importante para el acople del receptor con las proteínas G $\alpha_{i/o}$ , indicado por la disminución de la señalización de la isoforma H<sub>3</sub>R<sub>365</sub>, con 80 amino ácidos menos en dicha asa (Riddy y cols., 2016), y la reducción de la señalización del H<sub>3</sub>R de 445 amino ácidos inducida por mutación A280V, localizada en la misma asa (Flores-Clemente y cols., 2013).

La movilización de Ca<sup>2+</sup> de depósitos intracelulares se detectó cuando el H<sub>3</sub>R se expuso al agonista RAMH en células HEK-293T transfectadas con el H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$  (Figura 1E). Aunque este resultado parecía indeseado, apoya la formación del heterodímero A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R ya que no se observó funcionalidad del H<sub>3</sub>R<sub>427</sub>-G $\alpha_{qi4}$  al ser co-transfectado con el A<sub>2A</sub>R, sugiriendo una preferencia del H<sub>3</sub>R por formar heterodímeros y no homodímeros.

Un aspecto importante en la descripción de nuevos heterodímeros radica en la identificación de cambios en los perfiles de señalización de los receptores involucrados en la interacción. Al respecto, la eficacia de la señalización inducida por activación del A<sub>2A</sub>R por el agonista CGS-21680 aumentó sólo cuando se co-transfectó y co-activó al H<sub>3</sub>R. Este efecto podría ser explicado por un efecto facilitador del H<sub>3</sub>R en el acople del A<sub>2A</sub>R a las proteínas G $\alpha_s$  endógenas, lo que conduciría a una mayor eficacia del receptor para activar a dichas proteínas y por lo tanto a un aumento en la producción de AMPc. Dado el CGS-21680 indujo efectos similares en las células transfectadas solamente con el A<sub>2A</sub>R y en las que

expresaron a ambos receptores ( $A_{2A}R$  y  $H_3R$ ), los niveles de expresión de los receptores no parecen ser responsable de los efectos observados.

Canónicamente el  $H_3R$  se acopla a proteínas  $G\alpha_{i/o}$  que inhiben la actividad de las ciclasas de adenilato y en acuerdo con esta función, la activación del  $H_3R$  con RAMH disminuyó la formación de AMPc inducida por forskolina. De manera similar a lo observado en los ensayos de movilización de  $Ca^{2+}$ , la expresión del  $A_{2A}R$  modificó la respuesta del  $H_3R$  de inhibición a estimulación de la formación de AMPc. En los ensayos de movilización de  $Ca^{2+}$  no se detectó señalización del  $H_3R$  mediada por proteínas  $G\alpha_{q/14}$  unidas al  $A_{2A}R$  trunco, por lo que no se considera un cambio en la vía de señalización del  $H_3R$  como explicación para este efecto. Alternativamente, se propone que en el heterómero  $A_{2A}R/H_3R$  la señalización del  $A_{2A}R$  prevalece sobre la del  $H_3R$ , y que la señalización del  $H_3R$  se ve prevenida, probablemente por un impedimento estérico. Esta posibilidad se ve apoyada por la pérdida de la señalización de  $Ca^{2+}$  cuando el  $H_3R-G\alpha_{q/14}$  se co-expresó con el  $A_{2A}R$ .

Un resultado inesperado, pero interesante, fue el presumible agonismo sesgado del heterodímero  $A_{2A}R/H_3R$ , evidenciado por la incapacidad del ligando endógeno del  $H_3R$ , histamina, para inducir una señal de  $Ca^{2+}$ , contrastante con efecto observado con el agonista sintético RAMH. Esta discrepancia sugiere que la RAMH induce cambios conformacionales en el  $H_3R$  que permiten que la interacción con el  $A_{2A}R$  ocurra, mientras que los cambios conformacionales inducidos por la histamina parecen no ser suficientes para la heterodimerización, o al menos para que el heterómero señalice. La incapacidad de la histamina para inducir la activación de proteínas quiméricas quedó claramente descartada debido a que la activación del  $H_3R$  co-expresado con la proteína  $G\alpha_{q/14}$  indujo una clara señal de  $Ca^{2+}$ .

El presumible agonismo sesgado también podría ser explicado por el tiempo de residencia del agonista, entendido como el tiempo que un fármaco en particular se mantiene en su sitio de unión, y que determina directamente el tiempo que un receptor permanece en la conformación activa. Así, el estado activo inducido por la histamina podría tener una duración menor comparado con el causado por RAMH,

previniendo al primero de inducir la activación de proteínas G quiméricas unidas al A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>. Los estudios de unión de radioligando realizados con membranas estriatales usando histamina muestran que la primera hipótesis parece ser la más adecuada, ya que la histamina induce un aumento en la afinidad del A<sub>2A</sub>R por el agonista CGS-21680, opuesto a la disminución en la afinidad inducida por RAMH en la misma preparación. Este resultado sugiere que la histamina y RAMH inducen y estabilizan estados conformacionales del H<sub>3</sub>R distintos que afectan la interacción con el A<sub>2A</sub>R.

## 7.2 Localización sináptica de la interacción A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R

Un reporte previo indica que el A<sub>2A</sub>R se distribuye con densidades similares en membranas totales del estriado y en membranas aisladas de sinaptosomas estriatales y con una localización preferencial en la densidad post-sináptica en comparación con zona pre-sináptica (Rebola y cols., 2005). Los H<sub>3</sub>Rs se expresan pre- y post-sinápticamente, pero están enriquecidos en las terminales de las neuronas estriado-palidales, iNEMs (Morales-Figueroa y cols., 2014). Dada esta distribución, nuestros resultados sugieren una localización sináptica específica del heterodímero A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R que le permitiría una participación preferencial en la modulación pre-sináptica de la transmisión glutamatérgica y GABAérgica en los ganglios basales, particularmente en el neoestriado.

En el neoestriado, los A<sub>2A</sub>Rs se expresan en los cuerpos celulares y las terminales de las iNEMs (Schiffman y cols., 1991), así como en las terminales cortico-dNEMs, pero no en las proyecciones cortico-iNEMs (Quiróz y cols., 2009). También se ha reportado que los antagonistas KW-6002 y SCH-442416 permiten diferenciar las localizaciones del A<sub>2A</sub>R (Orrú y cols., 2011). Aunque no existen agonistas que puedan diferenciar poblaciones de A<sub>2A</sub>Rs, esta información podría ser valiosa para diseñar fármacos dirigidos a modular a los A<sub>2A</sub>Rs y H<sub>3</sub>Rs de manera dirigida, utilizando ligandos bivalentes dirigidos al heterodímero.

### 7.3 Interface de interacción del heterodímero A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R

La formación de heterodímeros de GPCRs continúa siendo un tema de debate debido a que para explicarlos existen dos teorías principales. La primera de ellas propone que estos complejos alcanzan la membrana celular como heterodímeros y por lo tanto existen como una nueva entidad proteica (Bulenger y cols., 2005). La segunda, propone que estos complejos son formados momentáneamente, resultado de colisiones a nivel de la membrana, lo que permite que los receptores se unan por milisegundos y formen la interacción (Hern y cols., 2010).

La cristalografía y los ensayos de modelado por homología y de acople (*docking*) proteína-proteína han revolucionado el estudio de los complejos proteicos ya que permiten entender mejor la naturaleza de estas interacciones. La aplicación de estos ensayos al heterodímero A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R reveló una interface de contacto que comprende a los segmentos TM2 y TM4 del A<sub>2A</sub>R y los dominios TM6 y TM7, así como la tercera asa intracelular (AI3) del H<sub>3</sub>R.

Aunque estos ensayos se realizaron en ausencia de ligando, la relevancia de este hallazgo radica en que las regiones involucradas en la interacción ayudan a explicar los datos obtenidos en los ensayos funcionales. Los estudios de cristalografía han indicado que los residuos Ser<sup>67</sup> en TM2, Leu<sup>267</sup> en el TM7, His<sup>264</sup> en la tercera asa extracelular (AE3) y Glu<sup>169</sup> en la AE2 del A<sub>2A</sub>R están involucrados en la unión del agonista CGS-21680 (Lebon y cols., 2015), el cual fue utilizado en todos los experimentos. Aunque el análisis final de la interacción A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R no indica que estos residuos interactúen directamente con el H<sub>3</sub>R, varios residuos alrededor de la Ser<sup>67</sup> en el TM2 parecen formar parte de la interface (ver Tabla 4), lo cual podría explicar los cambios en la afinidad observados en el A<sub>2A</sub>R.

Dado que la Ser<sup>67</sup> es crucial para el acople de otros agonistas del A<sub>2A</sub>R, como NECA o la misma adenosina, la interacción entre receptores que comprende residuos alrededor del residuo Ser<sup>67</sup> se torna aún más relevante. En el H<sub>3</sub>R, los residuos Asp<sup>206</sup> y Glu<sup>106</sup> en los dominios TM3 y TM5, respectivamente, son los principales responsables de la unión de agonistas. Estos segmentos no figuran en la interacción

de los receptores, explicando el por qué no observamos cambios en la afinidad del H<sub>3</sub>R en los ensayos de unión a radioligando.

Un resultado interesante fue que una parte de la AI3 y de la hélice 8 del H<sub>3</sub>R interactúan con el A<sub>2A</sub>R. Esta interacción parece tener lugar por una torsión de la AI3 del H<sub>3</sub>R hacia el A<sub>2A</sub>R (compárese la posición del AI3 en la Figura 18B y en la Figura 18C). Tanto la AI3 como la H8 del H<sub>3</sub>R han sido relacionadas con el acople del H<sub>3</sub>R a proteínas G, por lo que si estas regiones se ven comprometidas esto podría explicar la pérdida de señalización del H<sub>3</sub>R observada tanto en los ensayos de complementación funcional como en los de formación de AMPc, cuando se co-expresó al A<sub>2A</sub>R.

#### 7.4 Sobre la formación de heterodímeros

Además de la complejidad que implica estudiar los mecanismos moleculares y funcionales de los heterodímeros de GPCRs, otro tema a discutir es cómo se forman estos complejos. Existen dos modelos: el primero sugiere una pre-formación del dímero en vesículas intracelulares y por lo tanto que el dímero alcanza como tal a la membrana celular. El segundo modelo plantea que los receptores existen como monómeros que pueden acoplarse por colisiones “aleatorias” momentáneas para formar heterodímeros.

Aunque ambos modelos tienen evidencia que los apoya, es pertinente establecer una distinción en los modelos con base en el tipo de GPCR en estudio. Por ejemplo, los heterodímeros de receptores a GABA tipo B (GABA<sub>B</sub>), que pertenecen a de la clase C de los GPCRs, se forman entre un receptor a GABA tipo B<sub>1</sub> y un segundo receptor tipo B<sub>2</sub>. La interacción se establece entre los extremos carboxilos terminales de los receptores B<sub>1</sub> y el B<sub>2</sub>, y es de naturaleza hidrofóbica. Este complejo se forma desde el retículo endoplásmico y es indispensable para la expresión y funcionalidad de los receptores GABA<sub>B</sub> ya que en su estado monomérico no pueden acoplarse a proteínas G (Bettler y Tiao, 2006; Maurel y cols., 2008).

Sin embargo, los receptores de la clase A, como el receptor a vasopresina V<sub>2</sub>, el D<sub>1</sub>R y D<sub>2</sub>R, y el adrenoceptor β<sub>2</sub> (β<sub>2</sub>AR), pueden ser encontrados en la membrana

celular tanto como monómeros como formando dímeros (Maurel y cols., 2008; James y cols., 2006). Aunque la formación de dímeros conserva una relación lineal con la expresión de los receptores, resultado del incremento en interacciones transientes entre receptores (Calebrio y cols., 2013), el hecho que puedan encontrarse en las dos formas, descarta como absoluta la condición de ser preformados. Al respecto, estudios de microscopía de una sola molécula en células transfectadas con el receptor muscarínico M<sub>1</sub> y el  $\beta_2$ AR muestran claramente que la formación de dímeros se genera por movimientos brownianos en la membrana celular que llevan a una colisión de dos receptores por un espacio de ~1 segundo, tiempo en el que el heterodímero existe como tal (Hern y cols., 2010, Calebrio y cols., 2013).

En estas interacciones la libertad de movimiento en la membrana celular de un GPCR adquiere un papel importante en la formación de heterodímeros. Aunque no se tiene información sobre la movilidad del H<sub>3</sub>R en la membrana celular, podemos inferir, con base en sus varios efectos sobre la síntesis, la liberación y la captura de neurotransmisores, que su movilidad debería de ser amplia. Considerando que los eventos de señalización se llevan a cabo en *hot-spots* (Sungkaworn y cols., 2017), el H<sub>3</sub>R necesita tener la capacidad de movilizarse entre regiones cercanas a la zona activa para modular liberación y captura de neurotransmisores, y a regiones alejadas de la zona activa para regular la síntesis de neurotransmisores (Aquino-Miranda y cols., 2016). El A<sub>2A</sub>R se localiza en motivos ricos en colesterol y por lo tanto su movilidad en la membrana es restringida comparada con la del H<sub>3</sub>R (Lee y cols., 2012). Los resultados de co-inmunoprecipitación muestran una interacción constitutiva del A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R tanto en las células transfectadas como en el neocortico. Este resultado puede ser explicado por la premisa de movilidad membranal, donde al encontrarse los A<sub>2A</sub>Rs confinados a regiones de la membrana con baja movilidad y asumiendo que los H<sub>3</sub>R tiene una mayor libertad de movimiento, una población de H<sub>3</sub>Rs se encontraría accediendo a y retirándose de las regiones de baja movilidad, formando heterodímeros con los A<sub>2A</sub>Rs en estos ambientes lipofílicos.

Esta teoría le confiere mayor relevancia al heterodímero  $A_{2A}R/H_{3}R$ , ya que en estas regiones de baja movilidad se concentran las proteínas necesarias para la liberación de neurotransmisores por exocitosis (Tsui-Perchala y cols., 2002, Gil y cols., 2005) colocando al heterodímero  $A_{2A}R/H_{3}R$  en una posición preferente para modular la transmisión sináptica. Lo anterior concuerda con la exclusiva localización sináptica del heterodímero observada en los ensayos de unión de radioligando en membranas de sinaptosomas estriatales.

## 7.5 Los heterodímeros en el tratamiento de desórdenes neuronales

Los GPCRs son un atractivo blanco terapéutico para el desarrollo de fármacos y los heterodímeros de GPCRs abren nuevas posibilidades para el diseño de fármacos, debido a que ofrecen una nueva entidad farmacológica mediante la cual modular finamente la actividad neuronal. Aunque en modelos animales algunos heterodímeros de GPCRs han sido propuestos como blancos terapéuticos para patologías como la enfermedad de Parkinson (Pinna y cols., 2005), la adicción (Adams y cols., 2007) y la psicosis (Aghajanian y cols., 2000), su uso en pacientes tiene aún un largo camino por recorrer.

Entre los heterodímeros de GPCRs más explorados para el manejo farmacológico de enfermedades neuronales, se encuentra el formado por el  $A_{2A}R$  y el  $D_{2}R$ . En esta interacción, el  $A_{2A}R$  disminuye tanto la afinidad de unión como la funcionalidad del  $D_{2}R$ , y aunque en líneas celulares ambos receptores son internalizados como complejo, este fenómeno no se observa en tejido nativo (Hillion y cols., 2002; Fuxe y cols., 2005). Dado que alteraciones en la transmisión dopaminérgica estriatal están involucradas de manera crítica en trastornos como la Enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia, se ha propuesto emplear antagonistas del  $A_{2A}R$  en combinación con agonistas del  $D_{2}R$  para potenciar la señalización de estos últimos receptores (Scamells y Capuano, 2014; Kafka y Corbett, 1996; Ferré y cols., 2004). Otro heterodímero en el que el  $A_{2A}R$  está involucrado es el conformado con el receptor a glutamato metabotrópico 5 (mGluR5). Este heterodímero modula la función del  $D_{2}R$ , disminuyendo la conducta de giro inducida por quinpirole, un

agonista del receptor (Ferré y cols., 1999), y este efecto ha sido empleado para disminuir el consumo de alcohol por ratas, conducta relacionada fuertemente con el aumento de la transmisión dopaminérgica (Adams y cols., 2007).

De forma similar al A<sub>2A</sub>R, las interacciones del H<sub>3</sub>R con los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> han sido propuestas como blancos terapéuticos para el tratamiento de desórdenes neurológicos y psiquiátricos. En ambas interacciones la activación del H<sub>3</sub>R disminuye la funcionalidad de los receptores a dopamina, siendo estas interacciones de interés para el tratamiento de adicciones (Ellenbroek, 2013; Moreno y cols., 2014) y la enfermedad de Alzheimer (Rodríguez-Ruiz y cols., 2017).

Otros heterodímeros de GPCRs con aplicaciones terapéuticas incluyen las interacciones de los receptores a opioides  $\mu$  y  $\delta$  (Georges y cols., 2000) y los receptores  $\delta$  y  $\kappa$  (Waldhoer y cols., 2005), ambas interacciones empleadas para promover analgesia. La interacción mGluR<sub>2</sub> con el receptor a serotonina 5-HT<sub>2A</sub> ha mostrado disminuir los síntomas de psicosis y esquizofrenia (Aghajanian y cols., 2000).

Especulando sobre la potencial participación terapéutica del heterodímero A<sub>2A</sub>R/H<sub>3</sub>R y asumiendo el aumento observado en la señalización del A<sub>2A</sub>R al co-activar a los receptores, dirigir fármacos al heterómero localizado en las terminales cortico-estriatales incrementaría la liberación de glutamato. En las iNEMs, tanto el H<sub>3</sub>R como el A<sub>2A</sub>R inhiben la liberación de GABA. Dada la localización principalmente sináptica del heterodímero, sugiero que el complejo se localiza en las ramificaciones colaterales que las iNEMs proyectan sobre las dNEMs. La estimulación del heterodímero incrementaría la inhibición GABAérgica, causando una sobrestimulación de las dNEMs.

En ambas localizaciones, el resultado general de la activación sería la sobrestimulación de las dNEMs, lo que sería útil en patologías como el desorden de déficit de atención e hiperactividad, el autismo y el desorden obsesivo-compulsivo. En estos desórdenes existe un déficit en la transmisión glutamatérgica y por lo tanto un aumento en la liberación de glutamato o en la inhibición

GABAérgica a las dNEMs podría mitigar los síntomas de estas patologías al modular la actividad de estas neuronas.

Para abordar a los heterodímeros de GPCRs como blancos terapéuticos es necesario considerar que en un ambiente fisiológico un mismo tipo de GPCR puede ser encontrado como monómero, homodímero o heterodímero, generando una mezcla heterogénea de diferentes estados de activación y de señalización del receptor. Utilizar fármacos individuales para modular solamente a la población de receptores que se encuentre formando al heterodímero se convierte en un abordaje complicado, debido a que teóricamente el resultado de la activación de los receptores será la suma de los efectos de los monómeros, homodímeros y heterodímeros. Aunado a esto, es necesario considerar la expresión de los receptores en cuestión; mientras que algunos se encuentran localizados en poblaciones neuronales específicas (como el A<sub>2A</sub>R, expresado exclusivamente en las iNEMs), otros pueden estar presentes en varias poblaciones neuronales (como el H<sub>3</sub>R, que se expresa tanto en las iNEMs como en las dNEMs), complicando la predicción de un efecto fisiológico final.

Para evitar las complicaciones de este abordaje, se ha planteado usar ligandos bivalentes, los cuales se forman de dos farmacóforos dirigidos a cada uno de los receptores que forman el heterodímero, y unidos por un enlazador (Hiller y cols., 2013). Este abordaje, tiene la ventaja que la existencia de un heterodímero es condicionante para que ambos receptores puedan ser modulados, un factor dictado por la longitud del enlazador. Esta estrategia ha sido empleada para detectar al heterodímero A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R en líneas celulares (Soriano y cols., 2009), así como para explorar las características farmacológicas del heterodímero formado por el D<sub>2</sub>R y el receptor a neurotensina NTS<sub>1</sub>, donde estos ligandos mostraron especificidad para inducir vías de señalización propias del heterómero (Hubner y cols., 2016).

## **8. Conclusión**

Este estudio presenta por primera vez evidencia de la formación de un heterodímero entre los receptores a adenosina  $A_{2A}$  y a histamina  $H_3$ , basada en ensayos de complementación funcional y de co-inmunoprecipitación en células HEK-293T.

En los ensayos funcionales la co-activación de los receptores indujo un aumento de la señalización del receptor  $A_{2A}$  y atenuación de la función del receptor  $H_3$ . En el tejido estriatal de rata la interacción ocurre en las terminales nerviosas donde la activación del receptor  $H_3$  modifica la afinidad del receptor  $A_{2A}$  por un agonista selectivo. La interface entre los receptores se establece principalmente entre las regiones transmembranales TM4 del receptor  $A_{2A}$  y las regiones transmembranales TM6 y TM7 y la tercera asa intracelular del receptor  $H_3$ .

## 9. Perspectivas

Los resultados de esta tesis permiten plantear diversas perspectivas, entre las que se destacan las siguientes:

1. Analizar con mayor detalle la interacción  $A_{2A}R$ - $H_3R$  en sistemas nativos por ensayos de tr-FRET, así como la farmacología y dinámicas moleculares.
2. Determinar la participación del heterodímero en la transmisión glutamatérgica cortico-estriatal y GABAérgica intra-estriatal por ensayos de electrofisiología.
3. Evaluar las implicaciones de la interacción  $A_{2A}R$ - $H_3R$  en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas que afecten a los ganglios basales.
4. Estudiar los mecanismos moleculares *in vivo* que rigen la formación de heterómeros de GPCRs.

## 10. Referencias

1. Adams, C.L., Cowen, M.S., Short, J.L., Lawrence, A.J. Combined antagonism of glutamate mGlu5 and adenosine A<sub>2A</sub> receptors interact to regulate alcohol-seeking in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11:229-241 (2008)
2. Aghajanian, G.K., Marek, G.J. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* 31:302-312 (2000).
3. Albin, R., Young, A., Penney, J. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12: 366–375 (1989)
4. Aquino-Miranda, G., Escamilla-Sanchez, J., González-Pantoja, R., Bueno-Nava, A., Arias-Montaño, J.-A. Histamine H<sub>3</sub> receptor activation inhibits dopamine synthesis but not release or uptake in rat nucleus accumbens. *Neuropharmacology.* 106:91-101 (2016)
5. Bettler, B., Tiao, J. Y-H. Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABA<sub>B</sub> receptors. *Pharm. Ther.* 110:533-543 (2006)
6. Bolam J.P., Hanley J.J., Booth P.A., Bevan M.D., Synaptic organization of the basal ganglia. *J. Anat.* 196:527-542 (2000)
7. Bolam, J., Clarke, D., Smith, A., Somogyi, P. A type of aspiny neuron in the rat neostriatum accumulates [<sup>3</sup>H]gamma-aminobutyric acid: combination of Golgi-staining, autoradiography, and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* 213:121–134 (1983)
8. Brown, R., Haas, H. On the mechanism of histaminergic inhibition of glutamate release in the rat dentate gyrus. *J. Physiol.* 515:777-786 (1999)
9. Bulenger, S., Marullo, S., Bouvier, M. Emerging role of homo- and heterodimerization of G-protein coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharm. Sci.* 26:131-137 (2005)
10. Calebrio, D., Rieken, F., Wagner, J., Sungkaworn, T., Zabel, U., Borzi, A., Coccuci, E., Zurn, A., Lohse, M.J. Single-molecule analysis of fluorescently label G-protein-coupled receptors reveals complex with distinct dynamics and organization. *PNAS.* 110:743-748 (2013)
11. Chen VB., Arendall WB 3<sup>rd</sup>., Headd JJ., Keedy DA., Immormino RM., Kapral GJ., Murray LW., Richardson JS., Richardson DC. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica.* D66:12-21 (2010)
12. Clapham, J., Kilpatrick, G. Histamine H<sub>3</sub> receptors modulate the release of [<sup>3</sup>H]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex: evidence for the possible existence of H<sub>3</sub> receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.* 107: 919-923 (1992)
13. Cogé, F., Guénin, S.P., Audinot, V., Renouard-Try, A, Beauverger, P., Macia, C., Ouvry, C., Nagel, N., Rique, H., Boutin, J.A., Galizzi, J.P. Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H<sub>3</sub> receptor. *Biochem J.* 355:279-288 (2001)

14. Corvol, J., Studler, J., Schonn, J., Girault, J., Hervé, D. G $\alpha_{olf}$  is necessary for coupling D<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J. Neurochem.* 76: 1585–1558 (2001)
15. Cummings, J., Frankel, M. Gilles de la Tourette syndrome and the neurological basis of obsessions and compulsions. *Biol. Psychiatry.* 20:117–126 (1985)
16. Doreulee, N., Yanovsky, Y., Flagmeyer, I., Stevens, D.R., Haas, H.L., Brown, R.E. Histamine H<sub>3</sub> receptors depress synaptic transmission in the corticostriatal pathway. *Neuropharmacology.* 40:106-113 (2001)
17. Ellenbroek, B.A. Histamine H<sub>3</sub> receptors, the complex interaction with dopamine and its implications for addiction. *Br. J. Pharmacol.* 170:46-57 (2013)
18. Ellender, T.J., Huerta-Ocampo, I., Deisseroth, K., Capogna, M., Bolam, J.P. Differential Modulation of Excitatory and inhibitory striatal synaptic transmission by histamine. *J. Neurosci.* 31:15340-15351 (2011)
19. Ferré, S., Ciruela, F., Canals, M., Marcellino, D., Burqueno, J., Casadó, V., Hillion, J., Torvinen, M., Fanelli, F., Benedetti, P.D., Goldberg, S.R., Bouvier, M., Fuxe, K., Agnati, L.F., Lluís, C., Franco, R., Woods, A. Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders Parkinsonism. *Relat. Disord.* 10:265-271 (2004)
20. Ferré, S., Fredholm, B.B., Moreli, M., Popoli, P., Fuxe, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends. Neurosci.* 20:482-487 (1997)
21. Ferré, S., Popoli, P., Rimondini, R., Reggio, R., Kehr, J., Fuxe, K. Adenosine A<sub>2A</sub> and group I metabotropic glutamate receptors synergistically modulate the binding characteristics of dopamine D<sub>2</sub> receptors in the rat striatum. *Neuropharmacology.* 38:129-140 (1999)
22. Filmore, D. It's a GPCR world. *ACS Modern Drug Discovery.* 7:24-28 (2004)
23. Flores-Clemente, C., Osorio-Espinoza, A., Escamilla-Sánchez, J., Leurs, R., Arias, J.M., Arias-Montañó, J.A. A single-point mutation (Ala280Val) in the third intracellular loop alters the signaling properties of the human histamine H<sub>3</sub> receptor stably expressed in CHO-K1 cells. *Br. J. Pharmacol.* 170:127-135 (2013)
24. Foster, D.J., Conn, P.J. Allosteric modulation of GPCRs: New insights and potential utility for treatment of schizophrenia and other CNS disorders. *Neuron.* 94:431-446 (2017)
25. Fujita, A., Bonnavion, P., Wilson, M.H., Mickelsen, L.E., Bloit, J., de Lecea, L., Jackson, A.C. Hypothalamic Tuberomammillary nucleus neurons: Electrophysiological diversity and essential role in arousal stability. *J. Neurosci.* 37:9574-9592 (2017)
26. Fuxe, K., Ferré, S., Canals, M., Torvinen, M., Terasmaa, A., Marcellino, D., Goldberg, S.R., Staines, W., Jacobsen, K.X., Lluís, C., Woods, A.S., Agnati, L.F., Franco, R. Adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> heteromeric receptor complexes and their function. *J. Mol. Neurosci.* 26:209-220 (2005)

27. Galvan, A., Kuwajima, M., Smith, Y. Glutamate and GABA receptor and transporter in the basal ganglia: what does their subsynaptic localization reveal about their function? *Neuroscience*. 143: 351-375 (2006)
28. García, M., Floran, B., Arias-Montaña, J.-A., Young, J.M., Aceves, J. Histamine H<sub>3</sub> receptor activation selectively inhibits dopamine D<sub>1</sub> receptor-dependent [<sup>3</sup>H]GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*. 80: 241-249 (1997)
29. Georges, S.R., Fan, T., Xie, Z., Tse, R., Tam, V., Varghase, G., O'Dowd, B.F. Oligomerization of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J. Biol. Chem.* 275:26128-26135 (2000)
30. Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Sibley, D.R. D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striato-pallidal neurons. *Science*. 250:1429-1432 (1990)
31. Gil, C., Soler-Jover, A., Blasi, J., Aguilera, J. Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat striatal synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 329:117-124 (2005)
32. González-Sepúlveda, M., Rosel, S., Hoffmann, H.M., Castillo-Ruiz, M.M., Mignon, V., Moreno-Delgado, D., Vignes, M., Díaz, J., Sabriá, J., Ortiz, J. Cellular distribution of the histamine H<sub>3</sub> receptor in the basal ganglia: Functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission. *Basal Ganglia*. 3:1-13 (2013)
33. Gsandtner, I., Charalambous, C., Stefan, E., Ogris, E., Freissmuth, M., Zezula, J. Heterotrimeric G protein-independent signaling of a G protein-coupled receptor. Direct binding of ARNO/cytohesin-2 to the carboxyl terminus of the A<sub>2A</sub> adenosine receptor is necessary for sustained activation of the ERK/MAP kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 280:31898–31905 (2005)
34. Gsandtner, I., Freissmuth, M. A tail of two signals: the C terminus of the A<sub>2A</sub>-adenosine receptor recruits alternative signaling pathways. *Mol. Pharmacol.* 70: 447–449 (2006)
35. Gubitz, A.K., Widdowson, L., Kurokawa, M., Kirkpatrick, K.A., Richardson, P.J. Dual signaling by the adenosine A<sub>2a</sub> receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G protein and protein kinases in the same striatal nerve terminals. *J. Neurochem.* 67: 374-381 (1996)
36. Haber, S., Kowall, N., Vonsattel, J., Bird, E., Richardson, E. Gilles de la Tourette's syndrome. A postmortem neuropathological and immunohistochemical study. *J. Neurol. Sci.* 75: 225–241 (1986)
37. Han Y., Moreira I.S., Urizar E., Weinstein H., Javitch J.A. Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat. Chem. Biol.* 5:688-695 (2009)
38. Hern, J.A., Baig, A.H., Mashanov, G.I., Birdsall, B., Corrie, J.E.T., Lazareno, S., Molloy, J.E., Birdsall, N.J.M. Formation and dissociation of M<sub>1</sub> muscarinic

- receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *PNAS*. 107:2693-2698 (2010)
39. Heuss C., Gerber U., G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci*. 23:469–475 (2000)
  40. Hiller, C., Kuhhorn, J., Gmeiner, P. Class A G protein coupled receptor (GPCR) dimers and bivalent ligands. *J. Med. Chem*. 56:6542-6559 (2013)
  41. Hillion J., Canals M., Torvinen M., Casado V., Scott R., Terasmaa A., Hansson A., Watson S., Olah M.E., Canela E.I., Zoli M., Agnati L.F., Ibanez C.F., Lluís C., Franco R., Ferre S., Fuxe K. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors and dopamine D<sub>2</sub> receptors. *J. Biol. Chem*. 277:18091-18097 (2002)
  42. Hubne, H., Schellhorn, T., Gienger, M., Schaab, C., Kaindl, J., Leeb, L., Clark, T., Moller, D., Gmeiner, P. Structure-guided development of heterodimer-selective GPCR ligands. *Nature Communications*. 7:12298 (2016)
  43. Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graphics*. 14:33-38 (1996)
  44. James, J.R., Oliveira, M.I., Carmo, A.M., Laboni, A., Davis, S. A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer. *Nat. Methods*. 3:1001-1006 (2006)
  45. Jo, Y.H., Role, L.W. Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J. Neurosci*. 22:4794-4804 (2002)
  46. Kafka, S.H., Corbett, R. Selective adenosine A<sub>2A</sub> receptor/dopamine D<sub>2</sub> receptor interactions in animal models of schizophrenia. *Eur. J. Pharm*. 295:147-154 (1996)
  47. Kemp, J.M., Powell, T.P. The structure of caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos. Trans. R. Sot. Lond. B. Biol. Sci*. 262:383-401 (1971)
  48. Kemp, J., Powell, T. The cortico-striate projection in the monkey. *Brain*. 93: 525–46 (1969)
  49. Kirk, I.P., Richardson, P.J. Inhibition of striatal GABA release by the adenosine A<sub>2a</sub> receptor is not mediated by increases in cyclic AMP, *J. Neurochem*. 64: 2801-2809 (1995)
  50. Koos, T., Tepper, J., Wilson, C. Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J. Neurosci*. 24:7916–7922 (2004)
  51. Lebon, G., Edwards, P.C., Leslie A.G.W., Tate, C.G. Molecular determinants of CGS21680 binding to the human adenosine A<sub>2a</sub> receptor. *Mol. Pharmacol*. 87:907-915 (2015)
  52. Lee, J.Y., Lyman, E. Prediction for cholesterol binding sites on the A<sub>2A</sub> adenosine receptor. *J. Am. Chem. Soc*. 134:16512-16515 (2012)

53. Lovenberg, T.W., Roland, B.L., Wilson, S.J., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., Jackson, M.R., Erlander, M.G. Cloning and functional expression of the human histamine H<sub>3</sub> receptor. *Mol Pharmacol* 55:1101–1107 (1999)
54. Maurel, D., Comps-Agrar, L., Brock, C., Rives, M.-L., Bourrier, E., Ayoub, M.A., Bazin, H., Tinel, N., Durroux, T., Prézau, L., Trinquet, E., Pin, J.P. Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nature Methods*. 5:561-567 (2008)
55. Morales-Figueroa, G.E., Márquez-Gómez, R., González-Pantoja, R., Escamilla-Sánchez, J., Arias-Montaño, J.A., Histamine H<sub>3</sub> receptor activation counteracts adenosine A<sub>2A</sub> receptor-mediated enhancement of depolarization-evoked [<sup>3</sup>H]-GABA release from rat globus pallidus synaptosomes. *ACS Chem. Neurosci.* 20:637-645 (2015)
56. Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Hoffmann, H.M., Fuentes, S., Rosell-Vilar, S., Gasperini, P., Rodriguez-Ruiz, M., Medrano, M., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Lluís, C., Ferré, S., Ortiz, J., Canela, E., McCormick, P.J. Cocaine disrupts histamine H<sub>3</sub> receptor modulation of dopamine D<sub>1</sub> receptor signaling:  $\sigma_1$ -D<sub>1</sub>-H<sub>3</sub> receptor complexes as key targets for reducing cocaine's effects. *J. Neurosci.* 34:3545-3558 (2014)
57. Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12:88-118 (1965)
58. Nieto-Alamilla, G., Márquez-Gómez, R., García-Gálvez, A.-M., Morales-Figueroa, G.-E., Arias-Montaño, J.-A. The histamine H<sub>3</sub> receptor: structure, pharmacology and function. *Mol. Pharmacol.* 90:649-673 (2016)
59. Ohkubo, T., Shibata, M., Inoue, M., Kaya, H. Regulation of substance P release mediated via prejunctional histamine H<sub>3</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 273: 83-88 (1995)
60. Orru, M., Bakesova, J., Brugarolas, M., Quiroz, C., Beaumont, V., Goldberg, S.R., Lluís, C., Cortés, A., Franco, R., Casadó, V., Canela, E.I., Ferré, F. Striatal pre- and post-synaptic profile of adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists. *Plos One.* 6(1):e16088 (2011)
61. Pettersen, E.F., Goddard, TD, Huang, CC, Couch, GS, Greenblatt, DM, Meng, EC, Ferrin, TE. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25:1605-12 (2004)
62. Pierce, K., Premont, R., Lefkowitz, R. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:639–650 (2002)
63. Pinna, A., Wardas, J., Simola, N., Morelli, M. New therapies for the treatment of Parkinson's disease: adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists. *Life Sci.* 77:3259-3267 (2005)
64. Pillot, C., Heron, A., Cochois, V., Tardivel-Lacombe, J., Ligneau, X., Schwartz, J.C., Arrang, J.M. A detailed mapping of the histamine H<sub>3</sub> receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience.* 114:173–193 (2002a)

65. Pillot, C., Ortiz, J., Héron, A., Ridray, S., Schwartz, J.-C., Arrang, J.-M. Ciproxifan, a histamine H<sub>3</sub>-receptor antagonist/inverse agonist, potentiates neurochemical and behavioral effects of haloperidol in the rat. *J. Neurosci.* 15:7272-7280 (2002b)
66. Poelchen, W., Sieler, D., Wirkner, K., Illes, P. Co-transmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat. *Neuroscience.* 102:593-602 (2001)
67. Quiroz, C., Luján, R., Chigashima, M., Simoes, A.P., Lerner, T.N., Borycz, J., Kachroo, A., Canas, P.M., Orru, M., Schwarzschild, M.A., Rosin, D.L., Kreitzer, A.C., Cunha, R.A., Watanabe, M., Ferré, S. Key modulatory role of presynaptic adenosine A<sub>2A</sub> receptors in cortical neurotransmission to the striatal direct pathway. *Scientific World Journal.* 18:1321-1344 (2009)
68. Rebola, N., Canas, P.M., Oliveira, C.R., Cunha, R.A. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience.* 132:893-903 (2005)
69. Riddy, D.M., Cook, A.E., Diepenhorst, N.A., Bosnyak, S., Brady, R., Mannoury la Cour, C., Mocaer, E., Summers, R.J., Charman, W.N., Sexton, P.M., Christopoulos, A., Langmead, C.J. Isoform-specific biased agonism of histamine H<sub>3</sub> receptor agonists. *Mol. Pharmacol.* 91:87-99 (2016)
70. Rivera-Ramírez, N., Montejo-López, W., López-Méndez, M.C., Guerrero-Hernández, A., Molina-Hernández, A., García-Hernández, U., Arias-Montaño, J.A. Histamine H<sub>3</sub> receptor activation stimulates calcium mobilization in a subpopulation of rat striatal neurons in primary culture, but not in synaptosomes. *Neurochem. Int.* 101:38-47 (2016)
71. Rodríguez-Ruiz, M., Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Mallol, J., Cortés, A., Lluís, C., Canela, E.I., Casadó, V., McCormick, P.J., Franco, R. Heteroreceptor complexes formed by dopamine D<sub>1</sub>, histamine H<sub>3</sub>, and N-Methyl-D-Aspartate glutamate receptors as targets to prevent neuronal death in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 54:4537-4550 (2017)
72. Ryu, J., Yanai, K., Iwata, R., Ido, T., Watanabe, T. Heterogeneous distributions of histamine H<sub>3</sub>, dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in rat brain. *Neuroreport.* 5:621-624 (1994)
73. Scamemells, J.M., Capuano, B.P.J. The dopamine D<sub>2</sub> and the adenosine A<sub>2A</sub> receptors: Past, present and future trends for the treatment of Parkinson's disease. *Curr. Med. Chem.* 21:3188-3210 (2014)
74. Schiffmann, S.N., Jacobs, O., Vanderhaeghen, J.J. Striatal restricted adenosine A<sub>2</sub> receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. *J. Neurochem.* 57:1062-1067 (1991)
75. Schiffmann, S., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R., Ferré, S. Adenosine A<sub>2A</sub> receptors and basal ganglia physiology. *Prog. Neurobiol.* 83:277-292 (2007)

76. Schindelin, J., Rueden, C., Hiner, M.C., Eliceiri, K.W. The imageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 82:518-529 (2015)
77. Schlicker, E., Betz, R., Göthert, M. Histamine H<sub>3</sub> receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 337:588-590 (1988)
78. Schlicker, E., Fink, K., Detzner, M., Göthert, M. Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H<sub>3</sub> receptors. *J. Neurotransmission.* 93:1-10 (1993)
79. Schlicker, E., Fink, K., Hinterthaler, M. Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H<sub>3</sub> receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 340:633-638 (1989)
80. Smith, Y., Raju, D., Pare, J.-F., Sidibe, M. The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci.* 27:520–527 (2004)
81. Snyder, S.H. Adenosine as a neuromodulator. *Ann. Rev. Neurosci.* 8:103-124 (1985)
82. Somogyi, P., Priestley, J.V., Cuello, A.C., Smith, A.D., Takagi, H. Synaptic connection of enkephalin-immunoreactive nerve terminals in the neostriatum: a correlated light and electron microscopic study. *J. Neurocytol.* 11: 779-807 (1982)
83. Soriano, A., Ventura, R., Molero, A., Hoen, R., Casadó, V., Cortés, A., Fanelli, F., Albericio, F., Lluís, C., Franco, R. Royo, M. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor-antagonist/Dopamine D<sub>2</sub> receptor-agonist bivalent ligands as pharmacological tool for detect A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromers. *J. Med. Chem.* 52:5590-5602 (2009)
84. Sperlágha, B., Sershenb, H., Latjhab, A., Vizia, E.S. Co-release of endogenous ATP and [<sup>3</sup>H]-noradrenaline from rat hypothalamic slices: origin and modulation by  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Neuroscience.* 82:511-520 (1997)
85. Sungkaworn, T., Jobin, M.-L., Burnecki, K., Weron, A., Lohse, M.J., Calebrio, D. Single-molecule imaging reveals receptor-G protein interactions at cell surface hot spots. *Nature.* 550:543-547 (2017)
86. Surmeier, D., Kitai, S. Dopaminergic regulation of striatal efferent pathways. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4:915–919 (1994)
87. Taverna, S., Ilijic, E., Surmeier, D. Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 28:5504–5512 (2008)
88. Tsui-Perchala, B., Encinas, M., Milbrandt, J., Jhonson, E.M.Jr. Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* 25:412-417 (2002)
89. Tunstall, M., Oorschot, D., Kean, A., Wickens, J. Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J. Neurophysiol.* 88:1263–1269 (2002)

90. van Rijn, R.M., Harvey, J.H., Brissett, D.I., DeFriel, J.N., Whistler, J.L. Novel screening assay for the selective detection of G-protein-coupled receptor heteromer signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 344:179-188 (2013)
91. van Zundert, G.C.P., Rodrigues, J.P.G.L.M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P.L., Karaca, E., Melquiond, A.S.J., van Dijk, M., de Vries, S.J., Bonvin, A.M.J.J. The HADDOCK2.2 webserver: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *J. Mol. Biol.* 428:720-725 (2016)
92. Vangone, A., Spinelli, R., Scarano, V., Cavallo, L., Oliva, R. COCOMAPS: a web application to analyse and visualize contacts at the interface of biomolecular complexes. *Bioinformatics.* 27:2915-2916 (2011)
93. Wilson, C., Groves, P. Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: A study employing intracellular injection of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 194:599-615 (1980)
94. Zezula, J., Freissmuth, M. The A<sub>2A</sub>-adenosine receptor: a GPCR with unique features? *Br. J. Pharmacol.* 153:S184–S190 (2008)



## Functional histamine H<sub>3</sub> and adenosine A<sub>2A</sub> receptor heteromers in recombinant cells and rat striatum

Ricardo Márquez-Gómez<sup>a,\*,4</sup>, Meridith T. Robins<sup>b</sup>, Citlaly Gutiérrez-Rodelo<sup>c</sup>, Juan-Manuel Arias<sup>d</sup>, Jesús-Alberto Olivares-Reyes<sup>c</sup>, Richard M. van Rijn<sup>b</sup>, José-Antonio Arias-Montaño<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Cinvestav-IPN, Av. IPN 2508, Zacatenco, 07360 Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> Department of Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology, Purdue University, West Lafayette, USA

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN, Av. IPN 2508, Zacatenco, 07360 Ciudad de México, Mexico

<sup>d</sup> Programa de Neurociencias-UMCSE, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Av. de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, 54090 Estado de México, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 September 2017

Received in revised form

23 November 2017

Accepted 30 November 2017

Available online xxx

#### Keywords:

Adenosine A<sub>2A</sub> receptor

Histamine H<sub>3</sub> receptor

Striatum

GPCR heterodimers

Basal ganglia

### ABSTRACT

In the striatum, histamine H<sub>3</sub> receptors (H<sub>3</sub>Rs) are co-expressed with adenosine A<sub>2A</sub> receptors (A<sub>2A</sub>Rs) in the cortico-striatal glutamatergic afferents and the GABAergic medium-sized spiny neurons that originate the indirect pathway of the basal ganglia. This location allows H<sub>3</sub>Rs and A<sub>2A</sub>Rs to regulate the striatal GABAergic and glutamatergic transmission. However, whether these receptors can physically interact has not yet been assessed. To test this hypothesis, a heteromer-selective *in vitro* assay was used to detect functional complementation between a chimeric A<sub>2A</sub>R<sub>302</sub>-Gα<sub>q14</sub> and wild-type H<sub>3</sub>Rs in transfected HEK-293T cells. H<sub>3</sub>R activation with the agonist RAMH resulted in Ca<sup>2+</sup> mobilization (pEC<sub>50</sub> 7.31 ± 0.23; maximal stimulation, E<sub>max</sub> 449 ± 25% of basal) indicative of receptor heterodimerization. Functional H<sub>3</sub>R-A<sub>2A</sub>R heteromers were confirmed by co-immunoprecipitation and observations of differential cAMP signaling when both receptors were co-expressed in the same cells. In membranes from rat striatal synaptosomes, H<sub>3</sub>R activation decreased A<sub>2A</sub>R affinity for the agonist CGS-21680 (pKi values 8.10 ± 0.04 and 7.70 ± 0.04). Moreover, H<sub>3</sub>Rs and A<sub>2A</sub>Rs co-immunoprecipitated in protein extracts from striatal synaptosomes. These results support the existence of a H<sub>3</sub>R-A<sub>2A</sub>R heteromer with possible physiological implications for the modulation of the intra-striatal transmission.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Original article

## Clobenpropit, a histamine H<sub>3</sub> receptor antagonist/inverse agonist, inhibits [<sup>3</sup>H]-dopamine uptake by human neuroblastoma SH-SY5Y cells and rat brain synaptosomes



Elvia Mena-Avila<sup>1</sup>, Ricardo Márquez-Gómez<sup>1</sup>, Guillermo Aquino-Miranda, Gustavo Nieto-Alamilla, José-Antonio Arias-Montaño\*

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Zacatenco, Ciudad de México, México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 December 2016

Received in revised form 12 August 2017

Accepted 22 August 2017

Available online 30 August 2017

#### Keywords:

Clobenpropit

Dopamine transporter

Histamine H<sub>3</sub> receptor

Norepinephrine transporter

SH-SY5Y cells

### ABSTRACT

**Background:** Clobenpropit, a potent antagonist/inverse agonist at the histamine H<sub>3</sub> receptor (H<sub>3</sub>R), reduced the cytotoxic action of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in neuroblastoma SH-SY5Y cells transfected with the human H<sub>3</sub>R. We therefore set out to study whether this effect involved a receptor-independent action on dopamine transport.

**Methods:** The uptake of [<sup>3</sup>H]-dopamine was assayed in SH-SY5Y cells and rat striatal or cerebro-cortical isolated nerve terminals (synaptosomes). Clobenpropit binding to the human norepinephrine (NET) and dopamine (DAT) transporters was analyzed by molecular modeling.

**Results:** In SH-SY5Y cells, [<sup>3</sup>H]-dopamine uptake was inhibited by desipramine (selective NET inhibitor), GBR-12909 (selective DAT inhibitor), and fluoxetine (selective inhibitor of the serotonin transporter, SERT) with IC<sub>50</sub> values 37, 537, and 2800 nM, respectively. The potency rank order indicates that [<sup>3</sup>H]-dopamine uptake is primarily performed by NET. Clobenpropit inhibited [<sup>3</sup>H]-dopamine uptake (maximum inhibition 82.7 ± 2.8%, IC<sub>50</sub> 490 nM), and the effect was reproduced by the H<sub>3</sub>R antagonist/inverse agonist iodophenpropit, but not by the agonists R-α-methylhistamine and imipemip or the antagonists/inverse agonists ciproxifan and A-331440. Clobenpropit also inhibited [<sup>3</sup>H]-dopamine uptake by rat striatal and cerebro-cortical synaptosomes (-54.6 ± 11.3% and -46.3 ± 9.6%, respectively, at 10 μM). Modeling of the human NET and DAT obtained by homology from the crystal of *Drosophila melanogaster* DAT showed that clobenpropit can bind to a site also recognized in both transporters by nisoxetine, a potent NET inhibitor.

**Conclusion:** These data indicate a direct inhibitory effect of clobenpropit on catecholamine transport.

© 2017 Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

# Chapter 11

## Modulation by Histamine H<sub>3</sub> Receptors of Neurotransmitter Release in the Basal Ganglia

Ricardo Márquez-Gómez, Ana-Maricela García-Gálvez, Guadalupe-Elide Morales-Figueroa, and José-Antonio Arias-Montaña

**Abstract** Among the four G-protein coupled receptors (H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>) identified as the mediators of the biological effects of histamine, the H<sub>3</sub> receptor (H<sub>3</sub>R) distinguishes for its almost exclusive expression in the nervous system and its dual function as auto- and hetero-receptor that enables H<sub>3</sub>Rs to modulate the histaminergic and other neurotransmitter systems. The basal ganglia are neuronal nuclei that form a sub-cortical circuitry responsible for integrating motor and sensorial information originated in the cerebral cortex and the thalamus. The abundant presence of H<sub>3</sub>Rs in the basal ganglia confers these receptors a preferential and strategic position to modulate both the incoming and the outgoing synaptic information. In this chapter we review the control by H<sub>3</sub>Rs of the release of the neurotransmitters involved in the basal ganglia circuitry.

---

MINIREVIEW—A LATIN AMERICAN PERSPECTIVE ON G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

---

### The Histamine H<sub>3</sub> Receptor: Structure, Pharmacology, and Function

Gustavo Nieto-Alamilla, Ricardo Márquez-Gómez, Ana-Maricela García-Gálvez, Guadalupe-Elide Morales-Figueroa, and José-Antonio Arias-Montaña

*Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav-IPN), Zacatenco, Ciudad de México, México*

Received April 15, 2016; accepted August 24, 2016

---

#### ABSTRACT

Among the four G protein-coupled receptors (H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>) identified as mediators of the biologic effects of histamine, the H<sub>3</sub> receptor (H<sub>3</sub>R) is distinguished for its almost exclusive expression in the nervous system and the large variety of isoforms generated by alternative splicing of the corresponding mRNA. Additionally, it exhibits dual functionality as autoreceptor and heteroreceptor, and this enables H<sub>3</sub>Rs to modulate the histaminergic and other neurotransmitter systems. The cloning of the H<sub>3</sub>R cDNA in 1999 by Lovenberg et al. allowed for detailed studies of its molecular aspects. In this work, we review the

characteristics of the H<sub>3</sub>R, namely, its structure, constitutive activity, isoforms, signal transduction pathways, regional differences in expression and localization, selective agonists, antagonists and inverse agonists, dimerization with other neurotransmitter receptors, and the main presynaptic and postsynaptic effects resulting from its activation. The H<sub>3</sub>R has attracted interest as a potential drug target for the treatment of several important neurologic and psychiatric disorders, such as Alzheimer and Parkinson diseases, Gilles de la Tourette syndrome, and addiction.

---

## Histamine H<sub>3</sub> Receptor Activation Counteracts Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor-Mediated Enhancement of Depolarization-Evoked [<sup>3</sup>H]-GABA Release from Rat Globus Pallidus Synaptosomes

Guadalupe-Elide Morales-Figueroa, Ricardo Márquez-Gómez, Raúl González-Pantoja, Juan Escamilla-Sánchez, and José-Antonio Arias-Montaña\*

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Zacatenco, 07360 México, D.F., México

**ABSTRACT:** High levels of histamine H<sub>3</sub> receptors (H<sub>3</sub>Rs) are found in the globus pallidus (GP), a neuronal nucleus in the basal ganglia involved in the control of motor behavior. By using rat GP isolated nerve terminals (synaptosomes), we studied whether H<sub>3</sub>R activation modified the previously reported enhancing action of adenosine A<sub>2A</sub> receptor (A<sub>2A</sub>R) stimulation on depolarization-evoked [<sup>3</sup>H]-GABA release. At 3 and 10 nM, the A<sub>2A</sub>R agonist CGS-21680 enhanced [<sup>3</sup>H]-GABA release induced by high K<sup>+</sup> (20 mM) and the effect of 3 nM CGS-21680 was prevented by the A<sub>2A</sub>R antagonist ZM-241385 (100 nM). The presence of presynaptic H<sub>3</sub>Rs was confirmed by the specific binding of *N*- $\alpha$ -[methyl-<sup>3</sup>H]-histamine to membranes from GP synaptosomes (maximum binding,  $B_{max}$ , 1327  $\pm$  79 fmol/mg protein; dissociation constant,  $K_d$ , 0.74 nM), which was inhibited by the H<sub>3</sub>R ligands imnepip, clobenpropit, and A-331440 (inhibition constants,  $K_i$ , 0.28, 8.53, and 316 nM, respectively). Perfusion of synaptosomes with the H<sub>3</sub>R agonist imnepip (100 nM) had no effect on K<sup>+</sup>-evoked [<sup>3</sup>H]-GABA release, but inhibited the stimulatory action of A<sub>2A</sub>R activation. In turn, the effect of imnepip was blocked by the H<sub>3</sub>R antagonist clobenpropit, which had no significant effect of its own on K<sup>+</sup>-induced [<sup>3</sup>H]-GABA release. These data indicate that H<sub>3</sub>R activation selectively counteracts the facilitatory action of A<sub>2A</sub>R stimulation on GABA release from striato-pallidal projections.

**KEYWORDS:** Adenosine A<sub>2A</sub> receptor, histamine, histamine H<sub>3</sub> receptor, globus pallidus, basal ganglia, GABA release

